Aus der Universitäts-Frauenklinik Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Hans Roemer

Untersuchungen über unspezifische Phosphatasen in endokrinen Organen Aktivität, Verteilung und in Vitro-Reaktion auf gonadotrope Hormone

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
RUTH STÜTZEL
aus Bad Godesberg

1964

3061

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547602_0080

Aus der Universitäts-Frauenklinik Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Hans Roemer

Untersuchungen über unspezifische Phosphatasen in endokrinen Organen Aktivität, Verteilung und in Vitro-Reaktion auf gonadotrope Hormone

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
RUTH STÜTZEL
aus Bad Godesberg

1964

Dekan: Professor Dr. H. Harms

Erster Berichterstatter: Dozent Dr. G. Jung

Zweiter Berichterstatter: Professor Dr. H. Roemer

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Fotodruck PRÄZIS · Tübingen

Herrn Dozent Dr. Jung danke
ich sehr herzlich für seine
hilfreiche und stets freund-
liche Anleitung.

Inhalt.

	Seite
A. Einleitung und Fragestellung	1
B. Allgemeines und Literatur	
1. Fermente und Hormone	2
2. Möglichkeiten und Schwierigkeiten bei der Fermentuntersuchung	4
3. Literaturangaben über Phosphatasen	5
4. Literaturangaben über den Einfluß von Hormonen auf Fermente	6
C. Eigene Untersuchungen	
I. Methodik	
1. Vorarbeiten	10
2. Herstellung des Homogenates	12
3. Phosphatasebestimmung	13
4. Anfertigung der Eichkurve	14
5. Berechnung der Analyse	15
6. Zellfraktionierung	16
7. Hormonversuche	17
II. Ergebnisse	
1. Phosphataseaktivität in den einzelnen Organen	18
a. Hoden	19
b. Nebenniere	20
c. Corpus rubrum und Corpus luteum	21
d. Hypophyse	25
e. Zusammenstellung der Ergebnisse	26
2. Intrazelluläre Verteilung der Phosphatasen	26
a. Hypophyse	27
b. Hoden	30
c. Nebenniere	33
d. Zusammenfassung der Fraktionierungsversuche	35
3. Hormonversuche	37
D. Diskussion	48
E. Zusammenfassung	51
F. Literaturverzeichnis	52

A. Einleitung und Fragestellung.

Im Ovargewebe fanden JUNG und E. KIDESS [20, 21, 24] eine weit über das Maß der üblichen Fermentausrüstung der Zelle hinausgehende proteolytische Aktivität. Dieses Ergebnis weist auf eine besondere Aufgabe der Proteinasen des Ovars hin, etwa im Rahmen des morphologischen und funktionellen Wandels dieses Organs und seiner einzelnen Teile.

Bei der Stellung des Ovars als hypophysenabhängige innersekretorische Drüse ist es auch denkbar, daß die hohe proteolytische Aktivität eine Beziehung hat zur Wirksamkeit der Gonadotropine, die chemisch Glykoproteide sind. Bei dem Versuch, in vitro Gonadotropine auf die Proteinasen des Ovars einwirken zu lassen, fand JUNG [22] eine deutliche Beeinflussung der Aktivität durch follikelstimulierendes Hormon (FSH) und Luteinisierungshormon (LH), die im Follikelsaft und im Corpus luteum entgegengesetzte Wirkungen zeigten.

Möglicherweise findet sich hier ein Anhalt für den genaueren Ablauf einer Hormonwirkung durch eine spezifische Reaktion des Hormons mit dem Enzymsystem des Erfolgsorgans.

Um unspezifische Effekte auszuschließen und der Frage nach der Wertigkeit dieser Ergebnisse näherzukommen, müssen folgende Fragen untersucht werden:

1. Wie verhalten sich die Proteinasen anderer hypophysenabhängiger endokriner Organe?
2. Wie verhalten sich andere Enzyme im Ovar und in anderen endokrinen Organen?
3. Beeinflussen die Gonadotropine auch die Enzyme der Hypophyse selbst oder hypophysenunabhängiger endokriner Organe (z. B. Plazenta, Nebenschilddrüse) ?
4. Verändern auch andere Hormone, z. B. die anderen glandotropen Hormone der Hypophyse oder periphere Hormone, die Fermentaktivität im Ovar oder in anderen endokrinen Organen?

Aus der Fülle der Fragen befaßt sich diese Arbeit mit der Aktivität und der intrazellulären Verteilung der unspezifischen Phosphatasen in einigen endokrinen Organen und ihrer Reaktion auf Zusatz von gonadotropen Hormonen in vitro.

B. Allgemeines und Literatur.

1. Fermente und Hormone.[9, 10, 11, 17, 30.]

Ohne die Fermente als Biokatalysatoren wäre ein Leben unter den Bedingungen, wie sie auf der Erde herrschen, nicht denkbar. Fermente beschleunigen spontan nur träge ablaufende Reaktionen oder ermöglichen sie überhaupt erst. Dabei verschieben sie nicht die Gleichgewichtslage der Reaktion, die durch den Energieinhalt der Ausgangs - und Endprodukte gegeben ist, sondern sie vermindern die Aktivierungsenergie. Die Fermente greifen selektiv an im Gegensatz zu physikalischen Einwirkungen, wie z. B. Erwärmung, die alle Reaktionen nach der van t'Hoff'schen Regel gleichermaßen beschleunigt.

Durch die verschiedene Lage des Gleichgewichtes gleichzeitig oder nacheinander und gekoppelt ablaufender Vorgänge, durch Veränderungen der Mengenverhältnisse von Substrat, Enzym oder Coenzym, durch Aktivierung und Hemmung von Fermentsystemen durch Effektoren ergeben sich viele Steuerungs- und Sicherungsmöglichkeiten für das Zusammenwirken der einzelnen Reaktionen im Sinne des Gesamtorganismus und zur energetischen Ausnutzung der Vorgänge.

Fermente werden von jeder Zelle zum Eigenbedarf gebildet und von gewissen Organen außerdem für allgemeine Aufgaben des Organismus bereitgestellt, z. B. vom Magen und Pankreas.

Die Enzyme sind Eiweißstoffe, meist Proteide aus dem Trägereiweiß oder Apoferment und einem kleineren Molekül oder einem Metallion als Coferment. Die Eigenschaften der Fermente leiten sich zum großen Teil von ihrem Eiweißcharakter ab:

Sie unterliegen den Gesetzen kolloidaler Stoffe, werden also z. B. durch Dialysiermembranen zurückgehalten. Dadurch kann man Apoenzym und Coenzym oft trennen.

Sie lassen sich aussalzen, wovon man bei der Reindarstellung von Enzymen Gebrauch macht.

Sie werden oberhalb 50 bis 60° denaturiert.

Wegen ihrer Ampholytnatur ist ihre Wirksamkeit abhängig von der Wasserstoffionenkonzentration der Lösung.

Aus der Eiweißnatur der Fermente ergibt sich auch die Möglichkeit ihrer Vielfalt und ihrer Spezifität: Durch Kombination und Umstellung der häufig vorkommenden Aminosäuren ist eine große Zahl von Verbindungen mit verschiedener Oberflächenstruktur und Ladungsverteilung möglich. Die Oberfläche ist aber maßgebend für die Ausbildung des

Enzym - Substrat - Komplexes an den sogenannten Aktivitätszentren des Moleküls und bedingt dadurch die Substratspezifität des Fermentes. Diese Substratspezifität kann als Gruppenspezifität (z. B. bei den Phosphomonoesterasen), als Individualspezifität (z. B. Adenosintriphosphatase) oder sogar als Konfigurationsspezifität (z. B. D - Aminosäureoxydase) ausgeprägt sein.

Die PHOSPHATASEN gehören zu den Esterasen und als solche zu den Hydrolasen. Sie spalten anorganisches Phosphat aus organischen Phosphorsäureestern ab:

$$R - O - P(=O)(-OH)(-OH) \xrightarrow{H_2O} ROH + H_3PO_4$$

Diese Phosphatspaltung ist eine Gleichgewichtsreaktion wie alle Enzymreaktionen, aber sie läuft so stark exergonisch ab, daß sie praktisch irreversibel ist. So ist z. B. zur Umkehrung der Glukose - 6 - Phosphatase - Reaktion ein anderes Enzym, die Glukokinase, notwendig, das eine ATP - Spaltung als energieliefernden Prozeß mit einbezieht.

Die Phosphatasen kommen in allen Geweben vor und sind in allen Stoffwechselzweigen wichtig. Man unterscheidet spezifische und unspezifische Phosphatasen und unter diesen nach dem pH - Optimum die sogenannten sauren und alkalischen Phosphatasen. Die sauren Phosphatasen haben ihre höchste Aktivität bei pH 4,5 bis 6,0 und sollen besonders reichlich in der Prostata vorkommen. Die alkalischen Phosphatasen wirken optimal bei pH 7,0 bis 9,5 und kommen besonders im Knochen, in der Darmschleimhaut und in der Niere vor.

Wie schon aus dem breiten pH - Bereich der optimalen Wirksamkeit hervorgeht, ist unter "der sauren" oder "der alkalischen" Phosphatase kein einheitliches Enzym zu verstehen. BAMANN und Mitarbeiter 5 trennten z. B. die alkalische Phosphatase aus Leber in zwei verschiedene Enzyme auf, die sich in ihrer Beständigkeit, dem pH - Optimum und der Lokalisation in der Zelle unterscheiden.

Die HORMONE wirken auch in kleinen Mengen. Im Unterschied zu den Enzymen gehört ihre Bildung nicht zu den Fähigkeiten und Aufgaben jeder Zelle. Sie werden in spezifischen Zellen und Organen produziert und wirken nicht am Bildungsort, sondern sie werden durch das Blut vom Bildungsort zum Wirkungsort transportiert. Dadurch haben sie eine besondere Stellung in der Regelung der Lebensvorgänge im Sinne des Gesamtorganismus.

Chemisch gehören die Hormone hauptsächlich zu den Klassen der Pep-

tide, Eiweißstoffe und Steroide.

Die Wirkstoffe, Enzyme, Hormone und Vitamine, müssen im Sinne ihrer Aufgaben im Stoffwechselgeschehen gegenseitig in Beziehung stehen und einander beeinflussen. Die Notwendigkeit der Vitaminzufuhr findet teilweise ihre Erklärung darin, daß einige Vitamine oder ihre Derivate als Coenzyme in Erscheinung treten, z. B. das Thiaminpyrophosphat als Cocarboxylase. Es besteht aber kein Anhalt dafür, daß auch Hormone als Coenzyme auftreten. Die Frage nach der Art, wie die Hormone ihre Wirkung entfalten, und die Frage nach der Lokalisation und Spezifität des Hormoneinflusses sind noch weitgehend offen. Bei der zentralen Stellung der Enzyme im Stoffwechsel kann man erwarten, durch die Analyse von Hormoneinflüssen auf die Aktivität von Enzymen und Enzymgruppen einigen Aufschluß zu bekommen.

Allgemein ist nach DIRSCHERL [10] die Hemmung von Fermenten häufiger als die Aktivierung, vielleicht auch bei dem Fermentüberschuß der Zelle biologisch wichtiger.

Bei der Einwirkung von Hormonen auf Fermente ist aus der geringen Menge der Hormone auf ihre katalysatorartige Tätigkeit zu schließen, sei es, daß sie als Effektoren von Enzymen wirken, sei es, daß sie eine selbständige katalytische Aufgabe erfüllen. FUHRMANN [14] sieht z. B. für den Angriff der Steroidhormone unter anderen folgende Möglichkeiten:
Änderung der Gewebeenzymkonzentration,
Mitwirkung des Hormons als Komponente im Enzymsystem,
direkte Wirkung auf die Fermentaktivität,
Beeinflussung der Fermentaktivität über die Effektoren des Fermentes.

2. Möglichkeiten und Schwierigkeiten bei Fermentuntersuchungen.

Für Fermentuntersuchungen stehen einander zwei Möglichkeiten gegenüber: die histochemischen und die biochemischen Methoden. Auf histochemischem Wege wird die Lokalisation in Zellen und Geweben dargestellt. Bei den biochemischen Untersuchungen sind Beobachtungen am lebenden Menschen bzw. Versuche am lebenden Tier und Versuche in vitro mit isoliertem Material möglich.

Bei jedem Vorgang in Naturwissenschaft und Medizin kommt es auf das ganze System an, auf den Wirkstoff und das reaktionsbereite Gefüge am Wirkungsort mit allen Gegebenheiten des Milieus. Bei jedem

Versuch in vivo erfaßt man dieses ganze System, bekommt also sehr aussagekräftige Ergebnisse. Aber man nimmt eine schwer zu beurteilende Unübersichtlichkeit in Kauf. Beim Versuch in vitro ist die Reaktionslage übersichtlicher, entspricht aber nicht mehr den Verhältnissen im lebenden Organismus. Es handelt sich hier um die Messung von potentiellen Stoffwechselaktivitäten, nicht von tatsächlichen[29], da man meist optimale, jedenfalls willkürliche Bedingungen herstellt.

Beim Vergleich von in vitro- Versuchen ist der verschiedene Reinheitsgrad der Enzympräparationen zu bedenken. Ein Homogenat kommt den Verhältnissen der Zelle relativ nahe, reinere Enzyme oder gar kristallisiertes Enzymeiweiß enthalten weniger oder gar keine Beimengungen, beispielsweise von Effektoren, und reagieren unter Umständen anders als das Homogenat [10]. Auch die Vorbehandlung (häufiges Frieren und Tauen, Aufbewahrung bei Zimmertemperatur u.a. [26]) und das Alter der Präparation [10] verändern die Verhältnisse.

Vorsicht ist geboten beim Vergleich von Ergebnissen von Versuchen mit verschiedenen Tieren und bei der Übertragung tierexperimenteller Befunde auf den Menschen. Beispielsweise findet CORNER [7] bei verschiedenen Tieren verschiedene Verteilung der alkalischen Phosphatasen in den Zellen des Follikels und des Corpus luteum. Im menschlichen Ovar liegt die proteolytische Aktivität nur etwa 1/10 so hoch wie beim Schwein, was wohl im Zusammenhang mit der gleichzeitigen Reifung mehrerer Follikel beim Schwein steht [20,22].

3. Literaturangaben über Phosphatasen.

Über die Aktivität und intrazelluläre Verteilung der Phosphatasen in endokrinen Organen liegen nur wenige Daten vor. Zudem ist der Vergleich der Ergebnisse wegen der verschiedenen Versuchsbedingungen und Phosphataseeinheiten, die unter diesen Bedingungen definiert sind, erschwert.

JUNG und A. KIDESS [23] finden im Corpus luteum des Schweines etwa 2 1/2 mal so viel saure wie alkalische Phosphatase.Nach W. JUNG und STARK [26] enthält die Plazenta die beiden Phosphatasen im Verhältnis 3:2 zugunsten der alkalischen. AHMED und KING [1] finden in diesem Organ sogar 8 mal so viel alkalische wie saure Phosphatase.

Aus einer Arbeit von MELCHIOR und MICUTA [33] geht hervor, daß in der Hypophyse die saure Phosphatase etwa 3 mal so hoch liegt wie die alkalische. Die Phosphatasen der Hypophyse liegen im Vergleich zur

gleichzeitig untersuchten Niere, die saure auch im Vergleich zur Leber niedrig.

Beim Versuch der Zellfraktionierung liegt in allen Organen, die hier zum Vergleich angeführt werden sollen, die höchste Aktivität in der Fraktion Microsomen + Cytoplasma, während die Kerne keine oder wenig Phosphatasen enthalten (saure und alkalische Phosphatasen im Corpus luteum [23] und in der Plazenta [1, 26], saure Phosphatase der Prostata [41]).

4. Literaturangaben über den Einfluß von Hormonen auf Fermente.

Auf der Suche nach der Wirkungsweise der Hormone sind viele Beobachtungen gesammelt, Experimente angestellt und Deutungen versucht worden über die Reaktion von Fermenten und Fermentsystemen auf Hormonzusatz.

DIRSCHERL [10] gibt eine Zusammenstellung von Wirkungen verschiedener Steroidhormone auf verschiedene Enzyme (Katalase, D-Aminosäureoxydase, Cholinoxydase, Isocitricodehydrogenase, glykolytische Enzyme, Cholinesterase, Hyaluronidase, Adenosintriphosphatase). Dabei haben teilweise verschiedene Steroide verschiedene Wirkung. Wichtig erscheint, daß der Einfluß von Substrat- und Hormonkonzentration abhängig ist, sodaß man nicht von einer bestimmten Enzymkonzentration und einer Hormonkonzentration auf eine andere oder auf eine Wirkung des Hormons auf das Enzym schlechthin schließen kann. DIRSCHERL findet beispielsweise bei der Milchsäurebildung auf Zusatz von Desoxycorticosteron bei kleiner Enzymkonzentration eine Aktivierung, die der zugesetzten Hormonmenge proportional ist, während bei höherer Enzymkonzentration eine Hemmung eintritt, die zunächst mit steigender Steroidkonzentration stärker wird, dann mit weiter steigender Steroidkonzentration abnimmt. Diese "nivellierende Wirkung" könnte eine wesentliche Regulationsmöglichkeit darstellen und ist jedenfalls für die Beurteilung von Versuchsergebnissen wichtig.

MOOG und THOMAS [34] berichten über den Einfluß von Steroiden auf die alkalische Phosphatase in der Duodenalschleimhaut der säugenden Maus.

COX und MACLEOD [8] finden eine Aktivierung der alkalischen Phosphatase in bestimmten Kulturen menschlicher Epithelzellen durch Zusatz von Prednisolon zum Kulturmedium. Die saure Phosphatase bleibt da -

gegen unbeeinflußt.

Besonders wichtig im Zusammenhang dieser Arbeit erscheinen Angaben über Einflüsse von Hypophysenhormonen und peripheren Geschlechtshormonen auf Enzyme, vor allem auf die Phosphatasen. In diesen Rahmen gehört auch alles zyklusabhängige Enzymgeschehen,da ja die zyklischen Vorgänge ihrerseits abhängig sind vom Wechselspiel zwischen Gonadotropinen und peripheren Geschlechtshormonen.Auch fermentative Vorgänge in der Schwangerschaft können hormonabhängig sein.

Solche Beobachtungen liegen in größerer Zahl vor:

"Prolan" hemmt die Umwandlung des Histidins in Glutaminsäure durch die Histidase. [9]

Nach HIBBARD, JOHNSON und FIELD [16] wird die Phosphorylase des Corpus luteum von der Kuh durch Hypophysengesamtextrakt, Choriongonadotropin, Wachstumshormon aktiviert, während thyreotropes Hormon, FSH, LH, Prolactin (LTH) und ACTH keinen signifikanten Einfluß haben und Glucagon die Phosphorylase hemmt.

EVANS [12] beschreibt eine Aktivierung der ß-Glukuronidase im Rattenhoden durch Prolactin. Zwanzig zur Kontrolle untersuchte Substanzen geben keine derartige Wirkung.

Auch die Proteinasen zeigen zyklusabhängige Veränderungen. FUHRMANN [13] beschreibt einen Anstieg der Endopeptidasen im Endometrium in der beginnenden Sekretiosphase.

ROEMER [39] fand im Harn gesunder, geschlechtsreifer Frauen ein spezifisch gegen Ovareiweiß gerichtetes Enzym, das periodisch zur Zeit der Menstruation und der Ovulation auftritt (Uroovoproteinase).

Bei dem Versuch, in vitro Gonadotropine auf Follikelsaft und Homogenat aus Corpus luteum des Schweineovars einwirken zu lassen, fand JUNG [22] deutliche Veränderungen der proteolytischen Aktivität: Anteron, ein Serumgonadotropin mit FSH - Wirkung, aktiviert die Proteinasen im Liquor folliculi und hemmt sie im Corpus luteum. Primogonyl, ein Chorionqonadotropin mit vorwiegend LH - Wirkung, aktiviert die Proteinasen des Corpus luteum und hemmt die des Liquor folliculi.

Die Aktivierung von Kathepsin und Papain durch Oestradiol beschreibt PURR [38] und erklärt sie durch Ausbildung eines Redoxsystemes, wodurch wirksame SH - Gruppen entstehen. DIRSCHERL [10] konnte seine Ergebnisse nicht reproduzieren.

SAMUELS und HELMREICH [40] berichten über die Aktivierung der 3ß-ol-Dehydrogenase im Hoden nach Gabe von Chorionqonadotropin an hypophys-

ektomierte Ratten. Dieses Ergebnis ist naheliegend, da das Enzym bei der Steroidsynthese mitwirkt. Aus den einzelnen Versuchsergebnissen schließen die Autoren auf eine Stimulierung der Synthese des Enzyms, nicht auf eine Aktivierung des vorhandenen Enzymsystems.

TROEN und GORDON [43] finden bei Zusatz von Choriongonadotropin und Oestradiol gleichzeitig zur Perfusionsflüssigkeit bei Durchströmungsversuchen an der Plazenta eine Aktivierung des Zitronensäurezyklus, die sich in erhöhtem Zitratverbrauch anzeigt. Choriongonadotropin allein ist dagegen wenig, Oestradiol allein gar nicht wirksam.

Eine Reihe von biochemischen und histochemischen Untersuchungen befaßt sich mit dem Oestrogeneinfluß auf die alkalische Phosphatase und deren Aktivitätsänderungen und die verschiedenen Lokalisationen in den Geweben der weiblichen Geschlechtsorgane im Laufe des Zyklus. Allgemein wird die Aktivität der alkalischen Phosphatase durch Oestrogen erhöht, durch Progesteron gehemmt, sodaß im Zyklus ein Maximum um die Zeit des Follikelsprunges festgestellt wird. (Nach OBER und WEBER [37] wird das Maximum der Aktivität im Endometrium erst erreicht, wenn außer dem Oestrogen schon Progesteron einzuwirken beginnt.) Solche Beobachtungen konnten gemacht werden am Endometrium von ATKINSON und ENGLE [3], ATKINSON und ELFTMAN [2], JONES, WADE und GOLDBERG [19], sowie GIERING und ZARROW [15]. Eine ausführliche Zusammenstellung gibt FUHRMANN [14]. AUGUSTIN und HUwALD [4] zeigten den gleichen Effekt an der Tube.

Histochemische Arbeiten von CORNER [7], OBER[36], sowie MOSS, WRENN und SYKES [35] zeigen die Verschiebung der maximalen Aktivität der alkalischen Phosphatase während des Follikelwachstums von den Granulosazellen in die Theca interna. Die Verhältnisse sind für verschiedene Tiere verscheiden, besonders auch die Verteilung der Aktivität innerhalb des Corpus luteum. OBER findet an menschlichen Ovarien während der Rückbildung des Corpus luteum eine höhere Aktivität als während der Blütezeit. MOSS, WRENN und SYKES berichten dagegen über ein Phosphatase - Maximum am 9. bis 13. Tag nach Beginn des Oestrus und einen Abfall der Aktivität bei Rückbildung des Organs bei der Kuh.

Die Oestrogenwirkung auf die Aktivität der alkalischen Phosphatase ist aber nicht auf die Genitalorgane beschränkt. BURGER [6] und W. JUNG und STARK [27] untersuchten die Serumphosphatase, die nach BURGER keine signifikante Abhängigkeit vom Menstruationzyklus zeigt.

In beiden Arbeiten wird von einem Anstieg der alkalischen Phosphatase in der Spätschwangerschaft berichtet.

MELCHIOR und MICUTA [33] finden eine Aktivierung der alkalischen Phosphatase in der Hypophyse durch Diaethylstilboestrol.

C. Eigene Untersuchungen.

I. Methodik.

1. Vorarbeiten.

Das Prinzip der Bestimmung einer Fermentaktivität besteht darin, daß man unter genau definierten Bedingungen, z. B. hinsichtlich Temperatur und pH - Wert, die fermenthaltige Lösung für eine genau eingehaltene Zeit auf ein Substrat einwirken läßt und dann eines der Spaltprodukte quantitativ bestimmt. Das Substrat muß dabei im Überschuß vorhanden sein; denn nur unter dieser Bedingung liegt das Ferment vollständig als Ferment - Substrat - Komplex vor, und man kann den geradlinigen Teil der Zeit - Umsatz - Kurve als Maß für die Fermentkonzentration nehmen.

Die Methodik einer solchen Bestimmung studierte ich zunächst am Beispiel der Proteinasebestimmung nach ANSON mit Pepsin-, Trypsin- und Pankreatinlösungen verschiedener Stärke als Enzymlösung und 2,5% iger Rinderhämoglobinlösung als Substrat.Der pH - Wert wurde jeweils auf das Optimum des Enzyms abgestimmt:
für Pepsin pH 2 (0,5 m Glykokoll - Salzsäure - Puffer),
für Trypsin und Pankreatin pH 7,2 (Puffersystem aus primärem und sekundärem Phosphat).
Die Puffer wurden mit einem pH - Meter genau eingestellt. Die Inkubationszeit war definiert von der Zugabe der Fermentlösung bis zum Unterbrechen mit 10%iger Trichloressigsäure und betrug bei diesen Versuchen 30 und 45 Minuten.

Die Proteinasen spalten das Substrat so, daß freies Tyrosin und Tryptophan oder kurze Ketten entstehen, die eine dieser Aminosäuren am Ende tragen.Bei Zugabe von Trichloressigsäure fällt überschüssiges Hämoglobin aus, während diese kleinen Bruchstücke in Lösung bleiben und nach dem Filtrieren quantitativ bestimmt werden können. Dazu werden sie in stark sodaalkalischer Lösung mit dem Phenolreagenz nach FOLIN - CIOCALTEU in Reaktion gebracht. Die entstehende Blaufärbung wird im Photometer bei Filter S 72 gemessen. Von einer Eichkurve werden die zu den gemessenen Extinktionswerten gehörenden Mengen Tyrosin in γ abgelesen.

Um einen linearen Reaktionsverlauf zu erhalten, müssen die Zeiten kurz oder die Fermentkonzentrationen niedrig gehalten werden. Die Verkürzung der Zeit ist wegen der Technik des Pipettierens nur in engen Grenzen möglich. So muß man die Fermentkonzentration finden ,

bei der einerseits die Kurve sich möglichst weitgehend dem linearen Verlauf nähert, andererseits aber die Menge des Reaktionsproduktes

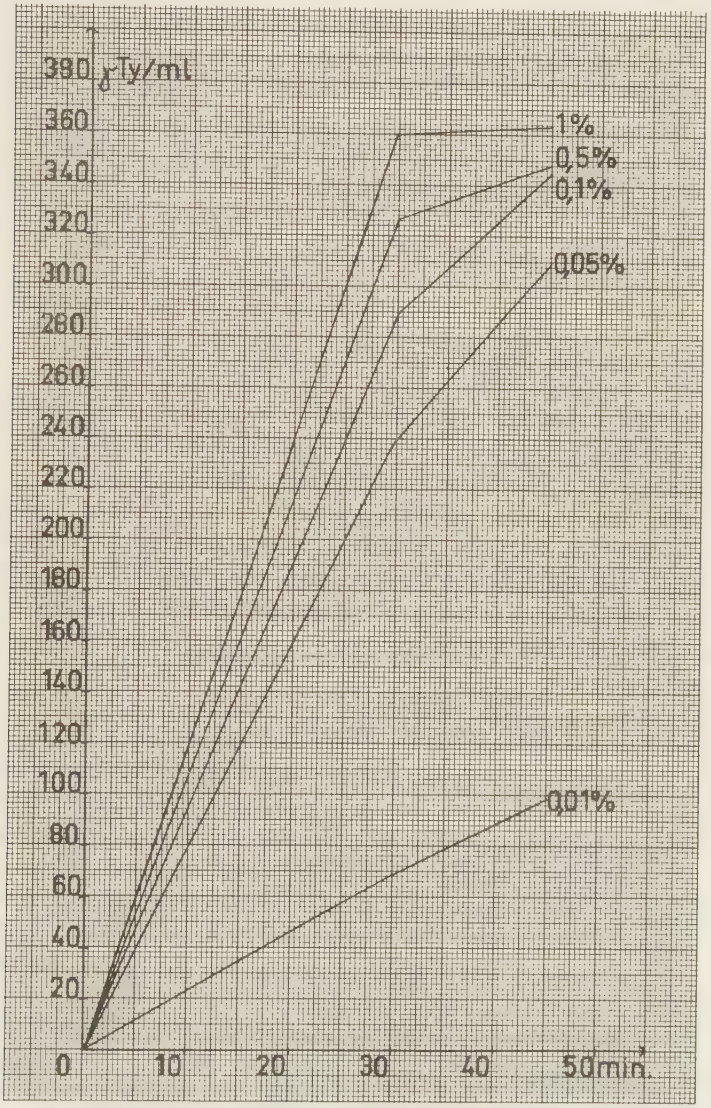


Abb. 1: Reaktionsverlauf der Spaltung von Rinderhämoglobin (2,5 %) durch Pepsinlösung (1 %, 0,5 %, 0,1 %, 0,05 %, 0,01 %) bei pH 2,0.

nicht so gering ist, daß sie in den Bereich der Fehlergrenze der Methode fällt.

Ein solcher Versuch mit verschiedenen Enzymkonzentrationen wurde z. B. für Pepsin bei pH 2 durchgeführt.(Abb. 1) Man sieht, wie die Kurven mit abnehmender Enzymkonzentration sich dem linearen Verlauf nähern und auch die Aktivitätsverhältnisse den Konzentrationen proportional werden, während bei hohen Enzymkonzentrationen durch die Hemmung der Reaktion eine solche Proportionalität nicht vorliegt.

Ähnliche Ergebnisse zeigten Pepsin bei pH 3,5 und Trypsin und Pankreatin bei pH 7,2. Die Aktivitäten waren im ganzen bei diesen Versuchen niedriger als bei Pepsin bei pH 2.

2. Herstellung des Homogenates [29].

Die folgenden Untersuchungen wurden an Homogenaten ausgeführt. Um möglichst gut und gleichmäßig wirksame Enzympräparationen zu erhalten, wurden die vom Tübinger Schlachthof freundlicherweise zur Verfügung gestellten Tierorgane sofort nach dem Schlachten entnommen und in eisgekühlten Gefäßen gesammelt und befördert. Die Organe wurden möglichst weitgehend von anhaftendem Bindegewebe befreit. Blut wurde durch kurzes Abwaschen mit 0,9 %iger Kochsalzlösung entfernt. Die gereinigten Gewebe wurden gewogen und unter Eiskühlung mit einer Schere möglichst klein zerschnitten. Dann wurden sie mit 30 %iger Rohrzuckerlösung zu einem Homogenat 1:3 verarbeitet.

Der Homogenisator besteht aus einem zylinderförmigen Glas mit Ausguß und einem eingeschliffenen Kunststoffkolben, der durch einen Motor in Drehbewegung versetzt und mit der Hand auf und ab geführt werden kann. Zwischen Zylinder und Kolben ist ein geringer Spielraum. In diesem Gerät wurde in kleinen Portionen unter Eiskühlung die Mischung von zerschnittenem Gewebe und Rohrzuckerlösung verarbeitet. Anschließend wurde das Homogenat durch ein auf einen besonderen Trichter doppelt aufgespanntes Leintuch gleichmäßiger Gewebedichte mit dem Pistill durchgetrieben.

Das so erhaltene Homogenat wurde entsprechend verdünnt und dann in die Versuche eingesetzt. Vor dem Versuch wurde die Enzymlösung höchstens eine Woche lang in der Tiefkühltruhe aufbewahrt.

3. Phosphatase - Bestimmung.

Die Bestimmung der sauren Phosphatase wurde nach LONDON und HUDSON [32], die der alkalischen Phosphatase nach JENNER und KAY [18] durchgeführt. Man läßt die enzymhaltige Lösung auf Na_2-ß-Glyzerinphosphat als Substrat einwirken und mißt danach den Zuwachs an anorganischem Phosphat im Ansatz.

Die Bestimmung der sauren Phosphatase wird bei pH 5 in einem 0,2 m Essigsäure - Azetat - Puffer mit Zusatz von Magnesiumionen ausgeführt. Die alkalische Phosphatase wird bei pH 9 in einem 0,2 m Glykokoll - Natronlauge - Puffer gemessen.

Herstellung der Lösungen:

Saure Phosphatase: 410 mg Magnesiumchlorid und
500 mg Na_2-ß-Glyzerinphosphat
werden in etwas Wasser gelöst, und nach Zugabe von 80 ml Essigsäure - Azetat - Puffer wird im Meßkölbchen auf 100 ml mit Wasser aufgefüllt.
Alkalische Phosphatase: Bei Bedarf werden 5 Teile Puffer pH 9 und 1 Teil einer 2,5 %igen wässrigen Lösung von Na_2-ß-Glyzerinphosphat gemischt.

Ansätze:

Saure Phosphatase:	Alkalische Phosphatase:
4 ml Puffer - Substrat	5 ml Puffer - Substrat
1 ml Enzymlösung	1 ml Enzymlösung
Inkubation 20 und 60 Minuten bei 37°.	
1 ml TCE 30 %	2 ml TCE 15 %.

Die Puffer - Substrat - Gemische und die Enzymlösungen werden getrennt 20 Minuten lang vorinkubiert zum Angleichen an die Temperatur des Wasserbades von 37°.

Bei jedem Ansatz lief ein Nullwert mit, der vor Zugabe der Enzymlösung schon Trichloressigsäure (TCE) enthielt, sodaß der Zustand vor Beginn der Reaktion erfaßt wurde und in Rechnung gesetzt werden konnte. Bei den Phosphatasen ist dieser Nullwert oft hoch und proportional zu den Verdünnungen des Homogenates. Er ist ungefähr gleich bei Bestimmung der sauren und der alkalischen Phosphatase im selben Homogenat und bezogen auf dieselbe Verdünnung. Auch die Nullwerte ohne Substrat zur Bestimmung der Eigenaktivität sind nur wenig niedriger. So stellt der Nullwert ein Maß für das vor Beginn der Enzymreaktion im Homogenat enthaltene anorganische Phosphat dar.

Die Eigenaktivität wird bestimmt durch eine Ansatzreihe, die statt

des Substrates Wasser enthält, sonst aber wie der Vollwert behandelt wird.

Bei Zusatz von TCE fällt in allen Proben alles Eiweiß aus, die Enzymreaktion ist beendet. Im Filtrat wird das anorganische Phosphat nach LOHMANN und JENDRASSIK [31] bestimmt.

Das Phosphat bildet in stark schwefelsaurer Lösung mit Ammoniummolybdat ein phosphormolybdänsaures Ammonium, das im Gegensatz zum unveränderten Ammoniummolybdat durch das sulfithaltige Amidolreagenz reduziert wird. Das entstandene Molybdänblau, ein Mischoxyd des Molybdäns, wird quantitativ bestimmt:

Meßansatz:

5 ml 2,5 %ige Lösung von $(NH_4)_2MoO_4$ in 5n H_2SO_4
2 ml Filtrat
1 ml Amidolreagenz
ad 25 ml Wasser.

Dieser Meßansatz wird 7 Minuten bei 37° und 7 Minuten bei 20° inkubiert, um eine haltbare Farbe (für etwa eine Stunde) zu bekommen. Die entstandene Blaufärbung wird im Photometer bei Filter I 61,7 in 10-mm Cuvetten gegen einen Leerwert gemessen.

Die Differenz zwischen dem Nullwert und dem inkubierten Wert entspricht dem bei der Reaktion gebildeten Phosphat. Der zur gemessenen Extinktion gehörende Wert an γ Phosphor (P) wird aus einer Eichkurve entnommen.

4. Anfertigung der Eichkurve.

Zur Herstellung der Eichkurve dient eine Lösung von analysenreinem primärem Kaliumphosphat KH_2PO_4, die in einem Liter 100 mg Phosphor, also 0,4394 g KH_2PO_4 enthält. Von dieser Lösung werden 10 ml im Meßkölbchen auf 100 ml aufgefüllt, sodaß 1 ml dieser verdünnten Lösung 10 γ P enthält.

In den Meßansatz wurden

1 ml = 10 γ P,
2 ml = 20 γ P,
4 ml = 40 γ P, u.s.w. eingesetzt. Aus der eingesetzten Menge Phosphor und der gemessenen Extinktion wurde die Eichkurve gezeichnet. (Abb. 2)

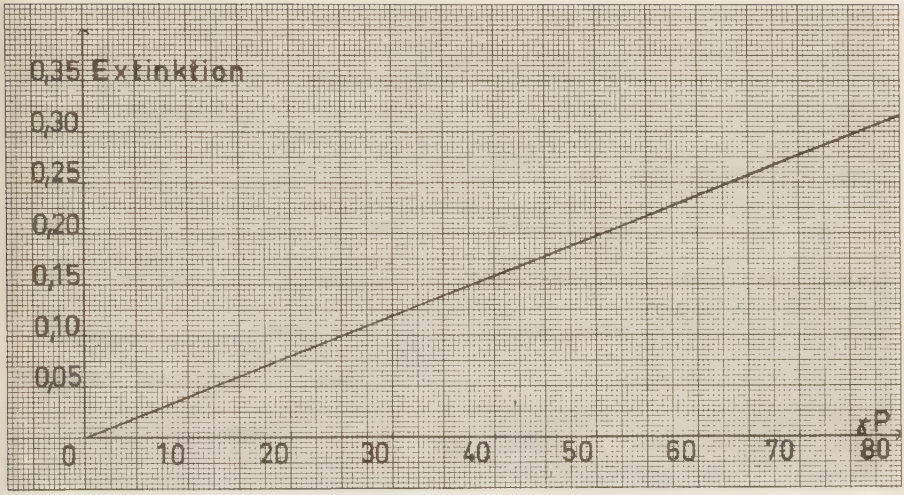


Abb. 2: Eichkurve für die Phosphatasebestimmung.

5. Berechnung der Analyse.

Der aus der Eichkurve entnommene Wert an γ P bezieht sich jeweils nur auf einen Teil des Ansatzes, muß also auf den ganzen Ansatz gleich 1 ml Enzymlösung umgerechnet werden, gelegentlich auch zum besseren Vergleich auf eine andere Verdünnung oder auf unverdünntes Homogenat.

Meist wird aber die spezifische Aktivität berechnet, um eine Reproduzierbarkeit der Werte zu erreichen. Dabei wird die gefundene Aktivität in Beziehung gesetzt zum Stickstoffgehalt der Enzymlösung als Maß für den Eiweiß- und damit auch Enzymgehalt der Lösung. Der Stickstoffgehalt wurde bestimmt nach dem Mikro - KJELDAHL - Verfahren durch Zerstörung der organischen Substanz mit Kaliumpermanganat in stark schwefelsaurer Lösung, Überdestillieren des Ammoniaks nach Zugabe von Natronlauge und Titration in der Vorlage mit n/50 Salzsäure.

Die spezifische Aktivität ist
(Aktivität – Eigenaktivität) / mg Stickstoff / Stunde,
berechnet aus den ersten Meßwerten, hier aus den 20 - Minuten - Werten. Bei allen untersuchten Organen war die Eigenaktivität so gering, daß sie bei der Bestimmung der spezifischen Aktivität vernachlässigt werden konnte.

Der einfache mittlere Fehler wurde berechnet nach der Formel

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$, wobei

s der einfache mittlere Fehler,
x der Einzelwert,
$\bar{x}$ der Mittelwert und
n die Anzahl der Versuche ist.

6. Zellfraktionierung.

Um die Verteilung der Enzymaktivität auf die einzelnen Zellbestandteile zu untersuchen, werden diese durch fraktioniertes Zentrifugieren voneinander getrennt.

Das Homogenat wurde dazu noch mit 3 Volumenteilen 30-prozentiger Rohrzuckerlösung verdünnt und dann bei 650 g 10 Minuten lang zentrifugiert. Dabei sedimentieren die Kerne, die nach zweimaligem Waschen mit 30 %iger Rohrzuckerlösung und erneutem Zentrifugieren in 0,9 %iger Kochsalzlösung aufgeschwemmt werden (Kernfraktion = K_3). Der Überstand wurde unter Kühlung 30 Minuten lang bei 24 000g zentrifugiert zur Gewinnung der Mitochondrienfraktion, die gleichfalls in Kochsalzlösung aufgeschwemmt wurde (Mit.).

Zur Trennung der Microsomen vom Cytoplasma wurde unter Kühlung 2 Stunden lang in der Ultrazentrifuge bei 41 000g zentrifugiert.

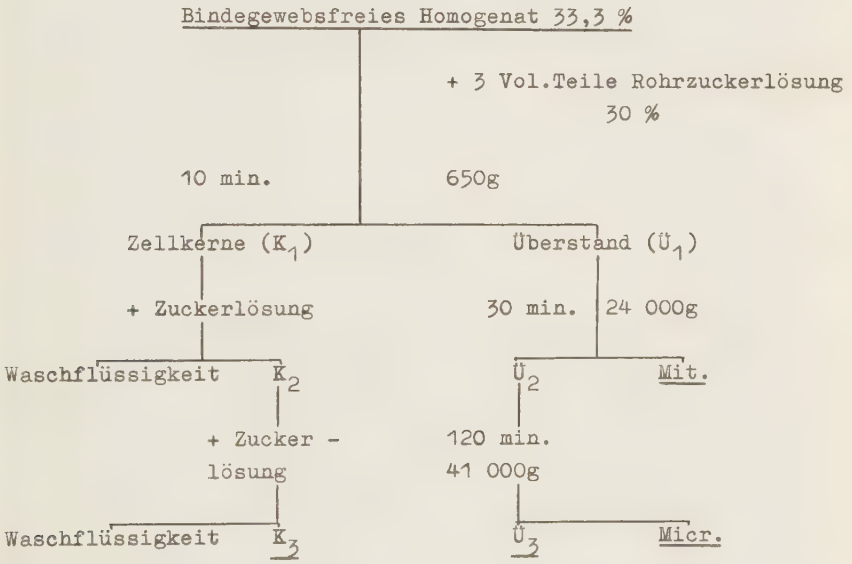
Die Aufschwemmungen der Kerne, Mitochondrien und Microsomen wurden meist auf 25 ml, ausnahmsweise auch auf 20 oder 50 ml aufgefüllt. Die Ausgangsmenge betrug jeweils 200 ml verdünntes Homogenat = 50 ml unverdünntes Homogenat. Die Microsomen wurden aus 100 ml des Überstandes $Ü_2$ gewonnen.

Die Reinheit der Kernfraktion wurde kontrolliert durch Anfertigung und Anfärbung eines Ausstriches. Außer wenigen erhaltenen Zellen und kleinen Zellverbänden waren dabei hauptsächlich gut erhaltene Kerne zu sehen. Im gefärbten Ausstrich der Mitochondrienfraktion waren auch noch einige Kerne zu erkennen. Die Trennung gelingt also nicht vollständig. Verunreinigungen einer wenig aktiven Fraktion mit einer sehr aktiven täuschen falsche Tatsachen vor. Andererseits entstehen beim Abgießen von Überständen immer Verluste, und zwar umso mehr, je sauberer man die Fraktionen trennen will. " Reinheit der Zellfraktionen und quantitative Ausbeute schließen sich im Grunde gegenseitig aus." So wird die Summe der Aktivitäten der einzelnen Zellfraktionen nicht

genau gleich der Aktivität des Homogenates sein.

Ein anderer Grund für diese Abweichungen ist nach LANG und SIE - BERT [29] der Unterschied zwischen der gesteuerten Enzymaktivität in der intakten Zelle und der Aktivität, die man in den isolierten Zellbestandteilen nach Zerstörung der Strukturen mißt.

Schema zum fraktionierten Zentrifugieren [29]:



7. Hormonversuche.

Um den Einfluß von Gonadotropinen auf die Phosphatase - Aktivität in endokrinen Organen in vitro zu prüfen, wurden Ansätze mit Hormon im Vergleich zu hormonfreien Enzymlösungen untersucht. Die Versuche wurden durchgeführt mit zwei Hypophysenvorderlappenhormonen, die uns freundlicherweise von der Firma SCHERING, Berlin zur Verfügung ge - stellt wurden:

Anteron, ein Gonadotropin mit vorwiegend FSH - Wirkung;

Primogonyl, ein Choriongonadotropin mit vorwiegend LH - Wirkung.

Die Hormone lagen in Pulverform vor und wurden zunächst in Wasser gelöst, sodaß diese Lösung 2 000 bzw. 200 Einheiten Hormon in 1 ml

enthielt. Aus dieser Lösung und der entsprechenden Verdünnung des Homogenates wurde ein Ansatz gemischt, der das Homogenat in den in Tabelle 1 angegebenen Konzentrationen und zusätzlich 1 000 bzw. 100 Einheiten Hormon in 1 ml enthielt. Diese Ansätze wurden bei 37° 60 Minuten lang vorinkubiert und dann als Enzymlösung in den Versuch eingesetzt.

Anfangs wurden außer den Ansätzen mit Hormon, Enzym und Substrat auch Bestimmungen ohne Enzym und ohne Substrat durchgeführt, um Einwirkungen des Hormons auf das Substrat in Abwesenheit des Enzyms und Einwirkungen des Hormons auf das Enzym in Abwesenheit des Substrates auszuschließen.

II. Ergebnisse.

1. Phosphataseaktivität in den einzelnen Organen.

Hoden, Nebenniere, Corpus luteum und Corpus rubrum als hypophysenabhängige Organe, sowie die Hypophyse selbst werden auf ihre Aktivität an unspezifischen sauren und alkalischen Phosphatasen untersucht. Alle Organe außer dem Hoden stammten vom Schwein. Der Hoden wurde vom Stier entnommen, da in der Schweineschlachtung kein Hoden anfällt.

Nach einigen Vorversuchen wurden die geeignetsten Verdünnungen des Homogenates für die Versuche ausgewählt:

Organ	Verdünnung des Homogenates für saure Phosphatase	alkalische Phosphatase
Hoden	1 : 10	1 : 5
Nebenniere	1 : 5	1 : 5
Corpus luteum	1 : 10	1 : 10
Corpus rubrum	1 : 10	1 : 10
Hypophyse	1 : 10	1 : 5

Tab. 1: Verdünnungen des Homogenates für die Phosphatasebestimmung in den einzelnen Organen.

a. Hoden.

Die höchste Aktivität der sauren Phosphatase wies der Hoden auf, während die alkalische Phosphatase dieses Organs nicht besonders aktiv war.

Ein Vorversuch zur Auswahl der Verdünnungen zeigte z. B. folgenden Reaktionverlauf:

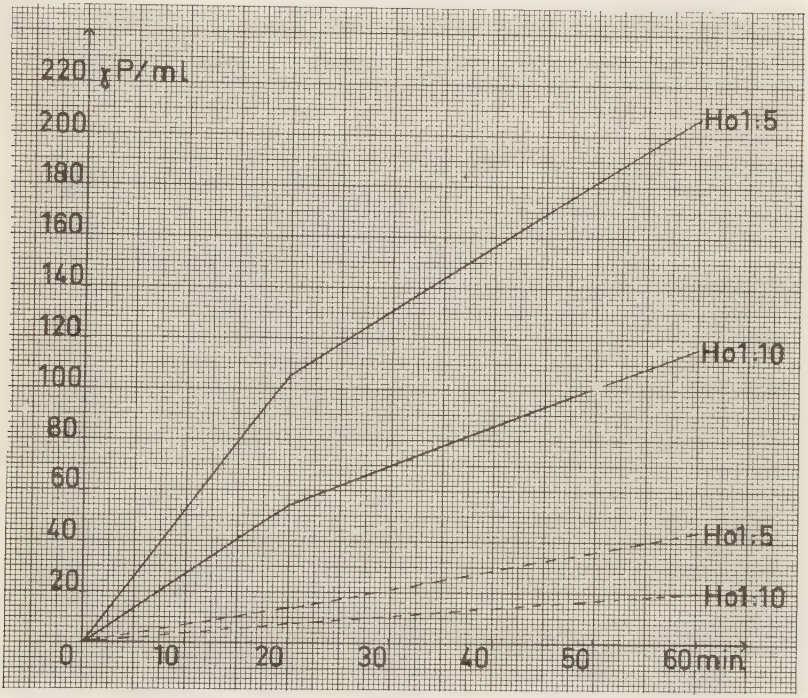


Abb. 3: Reaktionskurven für die sauren und alkalischen Phosphatasen im Hoden für die Verdünnungen 1:5 und 1:10.

Die durchschnittliche spezifische Aktivität im Hodengewebe aus 7 Versuchen betrug für
saure Phosphatase 335 ± 27,4 γ P/mg N/h,
alkalische Phosphatase 72 ± 18,4 γ P/mg N/h.

b. Nebenniere.

Bei der Nebenniere liegen saure und alkalische Phosphatase in ihrer Aktivität nur wenig verschieden, die alkalische etwas niedriger als die saure.

Die mittlere spezifische Aktivität aus 7 Versuchen betrug für die saure Phosphatase 138 ± 24,7 γ P/mg N/h, für die alkalische Phosphatase 104 ± 28,3 γ P/mg N/h.

Die Beispielskurve zeigt, daß bei einer Verdünnung des Homogenate 1:5 ein fast geradliniger Verlauf erreicht ist.

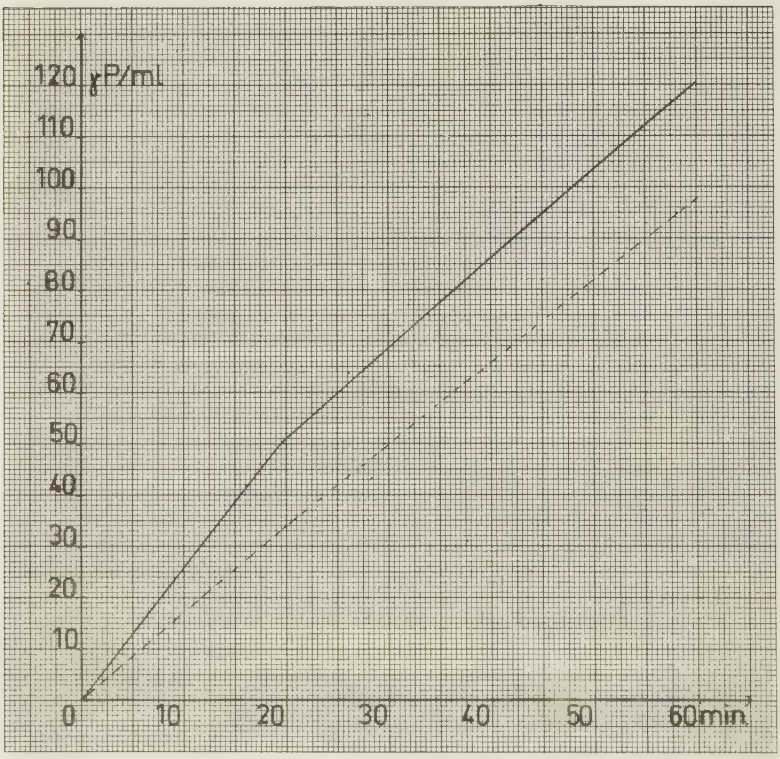


Abb.4: Reaktionsverlauf für beide Phosphatasen in der Nebenniere.

c. Corpus rubrum und Corpus luteum.

Einmal ergab sich die Gelegenheit, alle Entwicklungsstufen des Corpus luteum vergleichend zu untersuchen, weil die anfallenden Ovarien alle Altersklassen in hinreichender Menge enthielten.

Es wurden in den Versuch genommen:

1. Corpora rubra: große, rote Körper, mit Blut und gallertigem Inhalt ausgefüllt, nach möglichst weitgehender Entfernung des Blutes.
2. Jugendliche Corpora lutea: blaß rosa-graue, runde Körper von etwa 1 cm Durchmesser mit zarter Kapsel und saftigem, weichem Gewebe im Inneren.
3. Reife Corpora lutea: kleiner als die jugendlichen, gelb, mit etwas derberer Kapsel und festerem Gewebe im Ineren.
4. Alte Corpora lutea: klein und derb mit einer dicken bindegewebigen Kapsel, in der gelben Farbe schon etwas abgeblaßt.

Naturgemäß ist die Trennung der einzelnen Klassen nicht sehr scharf, wie auch aus der Beschreibung hervorgeht: Das Corpus rubrum geht allmählich in den jungen Gelbkörper über. Auch die reifen und alten Gelbkörper sind makroskopisch nicht scharf zu trennen, was z. B. die sehr unterschiedlichen Ergebnisse bei zwei Versuchen mit alten Corpora lutea teilweise erklären mag. Diese Feststellung mannt natürlich auch zur Vorsicht bei der Beurteilung eines einzelnen Versuches. Von Corpus rubrum und jungem Corpus luteum wurden mehrere Versuche durchgeführt, vom alten Gelbkörper liegen nur zwei, vom reifen nur ein Versuch vor.

Die gemeinsame Untersuchung aller Altersstufen, die trotz des zweifelhaften Wertes eines einzelnen Versuches beschrieben werden soll, ergibt folgendes Bild:

Das junge Corpus luteum hat die höchste Aktivität an saurer und alkalischer Phosphatase, die beide in der gleichen Größenordnung liegen. Dann folgt - bei Beurteilung der 20-Minuten-Werte - die saure Phosphatase des reifen Corpus luteum, die alkalische und saure Phosphatase des Corpus rubrum, die saure Phosphatase des alten und endlich die alkalische des reifen Corpus luteum. Die alkalische Phosphatase des alten Corpus luteum war bei diesem Versuch unmeßbar gering. Es ergibt sich also ein Anstieg und später ein Abfall der Aktivität in der Entwicklungsreine mit dem Gipfel beim jungen Corpus luteum (Abb. 5).

Berechnet man die spezifische Aktivität, ändert sich das Bild et-

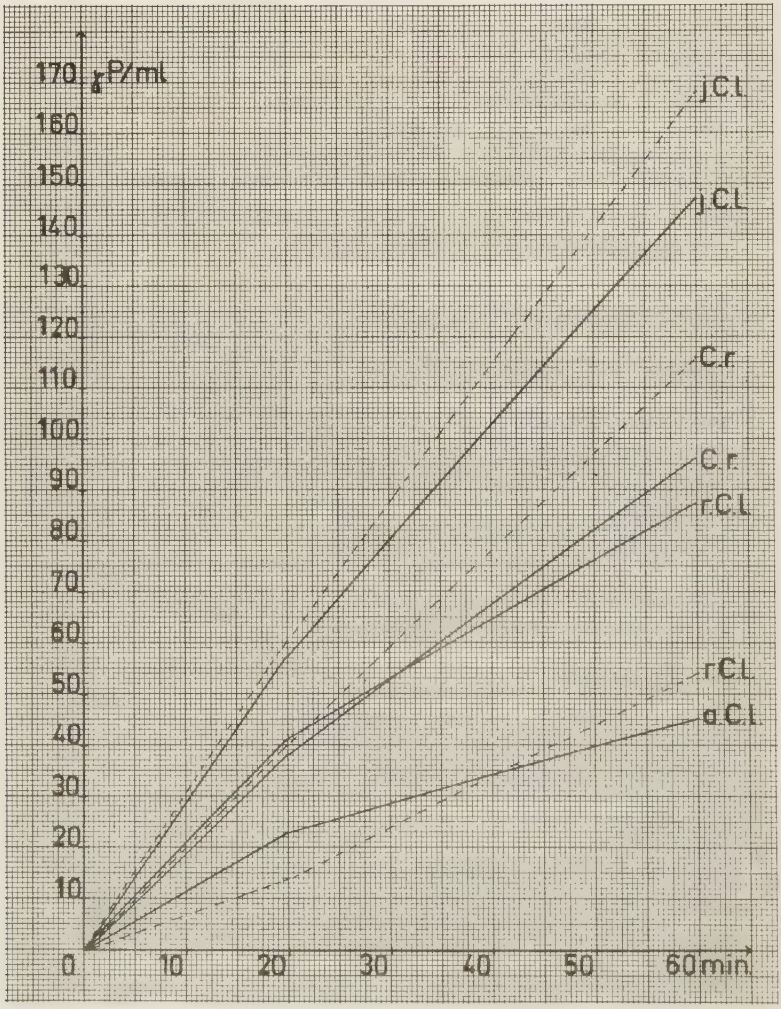


Abb. 5: Phosphatasen im Corpus rubrum und Corpus luteum verschiedenen Alters. Alle Homogenate 1:10 verdünnt.

was. Die Reihenfolge ist dann nach fallender spezifischer Aktivität:

Junges Corpus luteum	alkalische	Phosphatase	260	γ P/mg N/h
reifes Corpus luteum	saure	"	259	"
junges Corpus luteum	saure	"	247	"
altes Corpus luteum	saure	"	230	"
Corpus rubrum	alkalische	"	177	"
Corpus rubrum	saure	"	165	"
reifes Corpus luteum	alkalische	"	89	"
altes Corpus luteum	alkalische	"	0	" ,

wobei die Unterschiede der sauren Phosphatase des jungen, reifen und alten Corpus luteum gering sind, besonders, da diese Werte aus einem Einzelversuch zum Teil erheblich von anderen Ergebnissen und vom Mittelwert abweichen.

Im Vergleich zu den Phosphatasen wurden bei den verschiedenen Altersstufen des Corpus luteum auch die Proteinasen bestimmt. Diese steigen mit zunehmendem Alter stark an (Abb. 6).

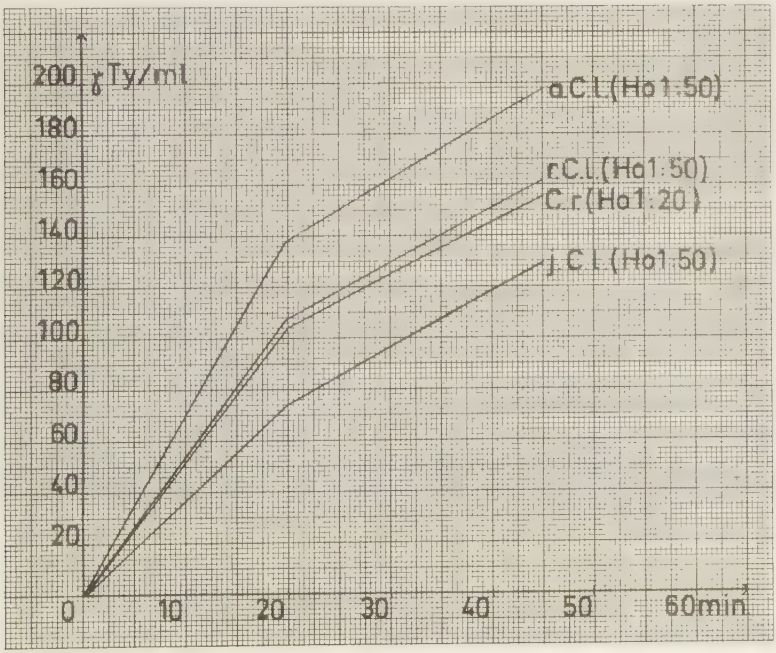


Abb. 6: Proteinase in Corpora lutea verschiedenen Alters und im Corpus rubrum.

Zur Veranschaulichung sollen die spezifischen Aktivitäten der sauren und alkalischen Phosphatasen und der Proteinase vergleichend dargestellt werden (Abb. 7).

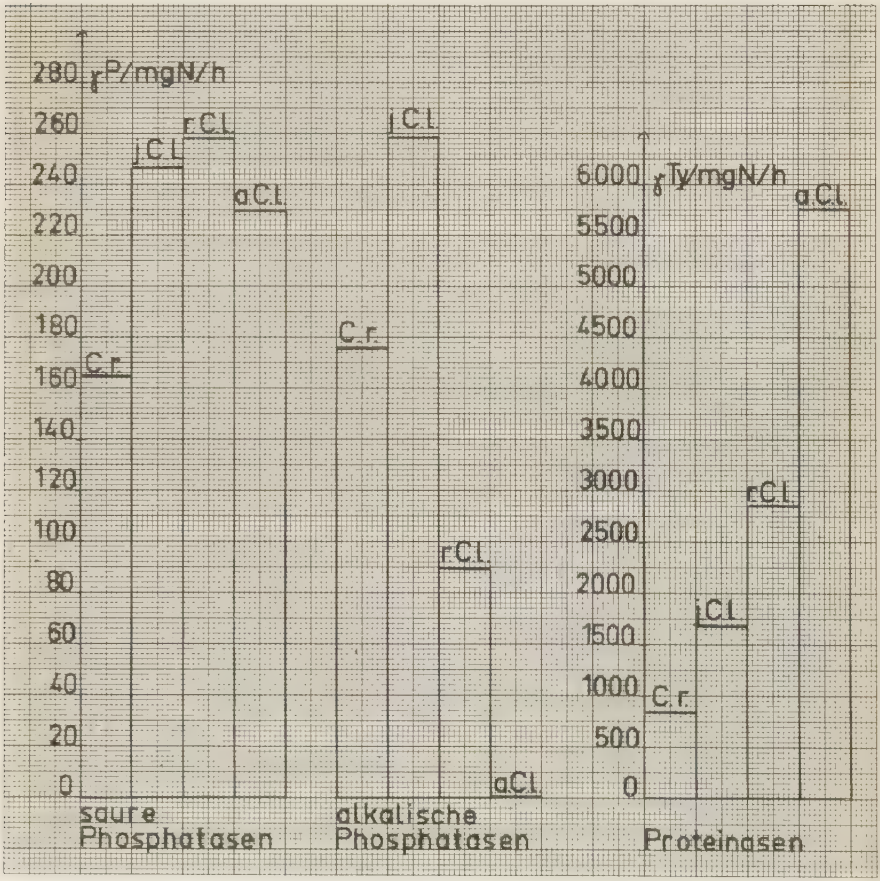


Abb. 7: Spezifische Aktivität der sauren und alkalischen Phosphatasen und der Proteinase verschieden alter Corpora lutea.

Die durchschnittliche spezifische Aktivität der Phosphatasen aus allen Versuchen zeigt die folgende Tabelle:

Organ	Zahl der Versuche	saure Phosphatase	alkalische Phosphatase
Corpus rubrum	4	155 ± 11,9	125 ± 28,1
junges Corpus luteum	6	216 ± 27,2	219 ± 37,0
reifes Corpus luteum	1	259	89
altes Corpus luteum	2	181 ± 70,0	40 ± 28,2

Tab. 2: Spezifische Aktivität im Corpus rubrum und Corpus luteum (in γ P/mg N/h).

d. Hypophyse.

Abbildung 8 stellt ein Beispiel für den Reaktionsablauf der Phosphatasebestimmung in der Hypophyse dar.

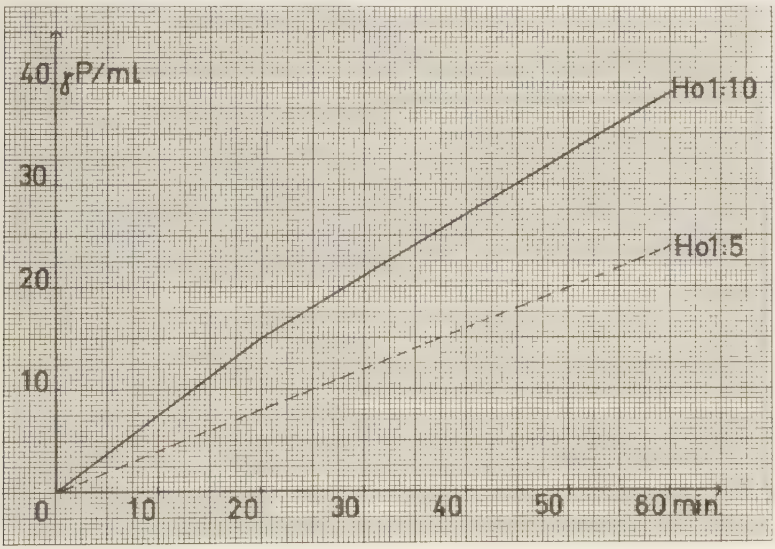


Abb. 8: Phosphatasen in der Hypophyse.

Die Hypophyse zeigte an beiden Phosphatasen die niedrigste Aktivität von allen untersuchten Organen. Besonders die alkalische Phosphatase lag mit einer spezifischen Aktivität von durchschnittlich 15 γ P/mg N/h so niedrig, daß die Deutung der Fraktionierungs- und

Hormonversuche schwierig wurde. Die 20-Minuten-Meßwerte lagen bei einer Verdünnung des Homogenates 1:5 zu niedrig im Verhältnis zur Fehlerbreite der Methode.Bei unverdünntem Homogenat, das einmal versuchsweise eingesetzt wurde, lag der Nullwert bei 298 γ P/ml Homogenat, sodaß eine Änderung im Verhältnis dazu klein war und der Fehler wiederum groß wurde. Auch längere Inkubationszeiten brachten keine besser zu beurteilenden Werte.

Der Mittelwert der spezifischen Aktivität aus 8 Versuchen betrug
für die saure Phosphatase 57 ± 5,8 γ P/mg N/h,
für die alkalische Phosphatase 15 ± 3,5 γ P/mg N/h.

e. Zusammenstellung der Ergebnisse.

Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die spezifischen Aktivitäten beider Phosphatasen in den untersuchten Organen und über deren Gehalt an anorganischem Phosphat. Die Werte für den anorganischen Phosphor wurden aus den Substratleerwerten berechnet, um möglichst nur den Phosphor des Homogenates zu erfassen und Verunreinigungen durch das Substrat jedenfalls auszuschließen.

Organ	saure Phosphatase γP/mg N/h	alkalische Phosphatase γP/mg N/h	anorganisches Phosphat γP/ml Homogenat
Hoden	335 ± 27,4	72 ± 18,4	178 ± 17,1
Nebenniere	138 ± 24,7	104 ± 28,3	302 ± 51,9
Corpus rubrum	155 ± 11,9	125 ± 28,1	128 ± 6,2
junges Corpus luteum	216 ± 27,2	219 ± 37,0	209 ± 19,6
Hypophyse	57 ± 5,8	15 ± 3,5	256 ± 35,3

Tab. 3: Spezifische Aktivitäten für saure und alkalische Phosphatasen und anorganisches Phosphat in den untersuchten Organen.

2. Intrazelluläre Verteilung der Phosphatasen.

Die intrazelluläre Verteilung der sauren und alkalischen Phosphatasen wurde für Hypophyse, Hoden und Nebenniere festgestellt.

a. Hypophyse.

Ein Fraktionierungsversuch ergab für die Hypophyse beispielsweise folgende Reaktionskurven: (Abb. 9 und 10)

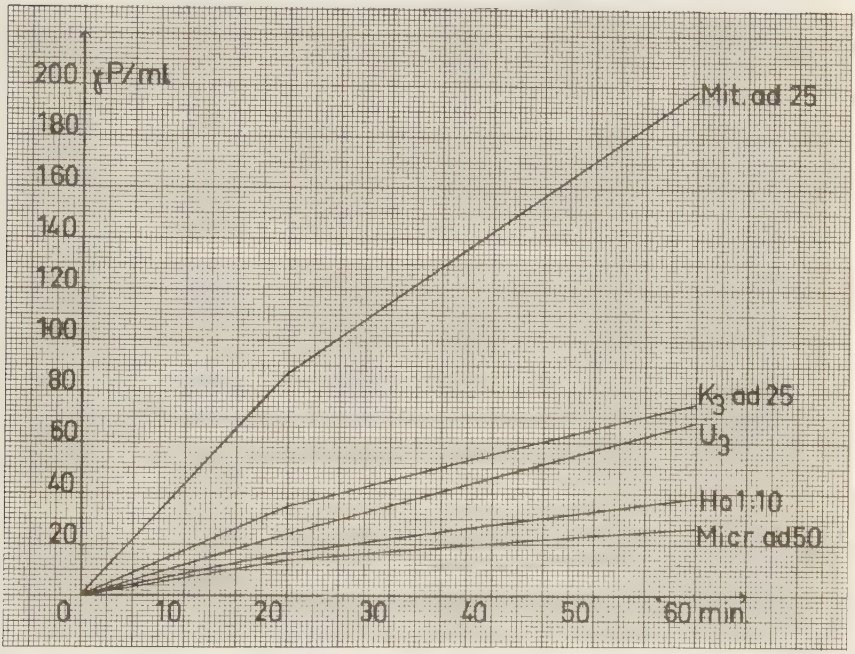


Abb. 9: Saure Phosphatase in den Fraktionen der Hypophyse.

Abkürzungen für die Abbildungen und Tabellen zu den Fraktionierungsversuchen (Abb. 9 bis 15 und Tab. 4 bis 10):

Ho = Homogenat
K_3 = Kernfraktion
Mit. = Mitochondrienfraktion
Micr. = Microsomenfraktion
U_3 = Überstand (Cytoplasma)

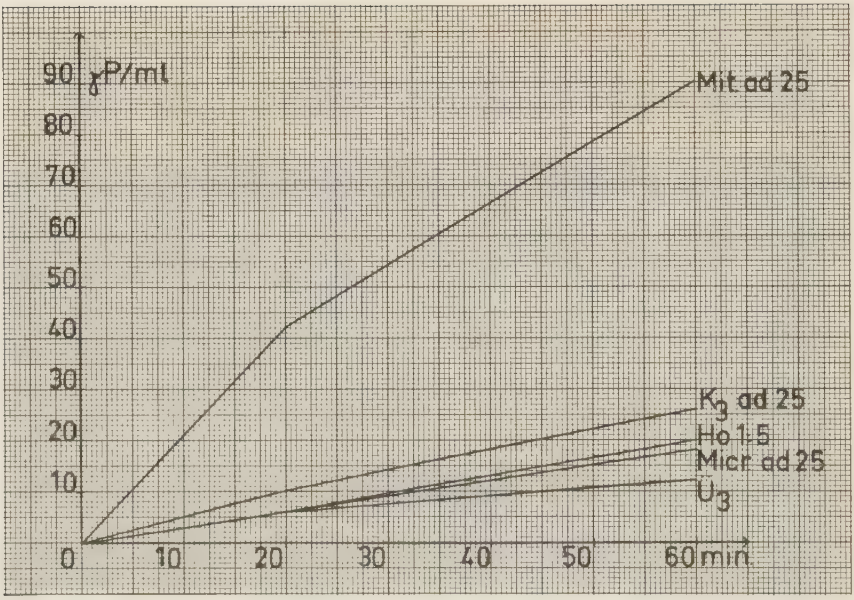


Abb. 10: Alkalische Phosphatase in den Fraktionen der Hypophyse.

Bei drei Versuchen ergaben sich folgende Mittelwerte für Stickstoffgehalt, Aktivität und spezifische Aktivität beider Phosphatasen in den Fraktionen der Hypophyse (Tab. 4 bis 6):

Fraktion	Stickstoffgehalt		Aktivität		spezifische Aktivität
	mg N	%	γP/h	%	γP/mg N/h
1 ml Ho	7,943	100,0	453	100,0	57 ± 4,2
daraus:					
K_3	0,713	9,0	45	9,9	63 ± 10,1
Mit.	2,359	29,8	130	28,7	55 ± 2,6
Micr.	0,753	9,5	72	15,9	95 ± 19,4
$Ü_3$	5,163	65,0	232	51,2	45 ± 5,1
Summe	8,988	113,3	479	105,7	

Tab. 4: Stickstoffgehalt, Aktivität und spezifische Aktivität der sauren Phosphatase in den Fraktionen der Hypophyse.

Fraktion	Stickstoffgehalt mg N	%	Aktivität γP/h	%	spez. Aktivität γP/mg N/h
1 ml Ho	8,050	100,0	89	100,0	11 ± 0,0
daraus:					
K_3	0,675	8,4	11	12,4	16 ± 3,3
Mit.	2,219	27,6	51	57,3	23 ± 8,8
Micr.	0,770	9,6	18	20,2	24 ± 3,6
$Ü_3$	5,090	63,2	76	85,4	15 ± 2,8
Summe	8,754	108,8	156	175,3	

Tab.5: Stickstoffgehalt, Aktivität und spezifische Aktivität der alkalischen Phosphatase in den Fraktionen der Hypophyse (nur 2 Versuche).

Fraktion	Stickstoffgehalt mg N	%	Aktivität γP/h	%	spez. Aktivität γP/mg N/h
1 ml Ho	7,943	100,0	103	100,0	13 ± 0,7
daraus:					
K_3	0,713	9,0	9	8,7	13 ± 5,5
Mit.	2,359	29,8	38	36,9	16 ± 4,5
Micr.	0,753	9,5	24	23,3	32 ± 8,7
$Ü_3$	5,163	65,0	46	44,7	9 ± 1,6
Summe	8,988	113,3	117	113,6	

Tab. 6: Sickstoffgehalt, Aktivität und spezifische Aktivität der alkalischen Phosphatase in den Fraktionen der Hypophyse bei Berechnung aus 60- bzw. 120-Minuten-Meßwerten.

Die höchste Aktivität hat bei der sauren Phosphatase der Überstand, der aber auch den größten Anteil am Stickstoffgehalt hat, sodaß die spezifische Aktivität sogar niedriger als beim Homogenat liegt. Die höchste spezifische Aktivität weist die Microsomenfraktion auf. Auffallend hoch ist auch die spezifische Aktivität der Kerne.

Auch bei der alkalischen Phosphatase zeigen die Microsomen die höchste spezifische Aktivität. Besonders hoch liegen auch die Mi-

tochondrien. Allerdings sind die Werte für die alkalische Phosphatase sehr vorsichtig zu beurteilen: Ihre Summe liegt durchschnittlich bei 175,3 % der Aktivität des Homogenates, alle spezifischen Aktivitäten liegen höher als die des Homogenates. Betrachtet man zum Vergleich ausnahmsweise die Werte, die aus den längeren Inkubationszeiten (60 bzw. 120 Minuten) berechnet wurden, so liegen wi der die Microsomen am höchsten, die Mitochondrien folgen aber erst im Abstand, und der Überstand weist einen Wert unter dem des Homogenates auf wie bei der sauren Phosphatase.

b. Hoden.

Beim Stierhoden liegen alle Werte bedeutend höher als bei der Hypophyse. Die Verhältnisse der Aktivitäten der einzelnen Fraktionen sind etwas anders, vor allem zeigen beim Hoden die Kerne mit Abstand die niedrigste spezifische Aktivität bei beiden Phosphatasen.

Aus zwei Versuchen ergaben sich die in Tabelle 7 und 8 dargestellten Mittelwerte.

Fraktion	Stickstoffgehalt		Aktivität		spez. Aktivität
	mg N	%	γ P/h	%	γ P/mg N/h
1 ml Ho	4,718	100,0	1576	100,0	334 ± 8,5
daraus:					
K_3	0,376	8,0	34	2,2	90 ± 24,8
Mit.	0,724	15,4	148	9,4	205 ± 17,7
Micr.	0,564	12,0	207	13,1	367 ± 29,7
$Ü_3$	3,948	83,7	1169	74,2	296 ± 30,4
Summe	5,612	119,1	1558	98,9	

Tab. 7: Stickstoffgehalt, Aktivität und spezifische Aktivität der sauren Phosphatase in den Fraktionen des Stierhodens.

Fraktion	Stickstoffgehalt mg N	%	Aktivität γ P/h	%	spez. Aktivität γ P/mg N/h
1 ml Ho	4,718	100,0	377	100,0	80 ± 3,7
daraus:					
K_3	0,376	8,0	9	2,4	24 ± 0,0
Mit.	0,724	15,4	62	16,4	85 ± 1,4
Micr.	0,564	12,0	78	20,7	139 ± 21,9
$Ü_3$	3,948	83,7	205	54,4	52 ± 1,0
Summe	5,612	119,1	354	93,9	

Tab. 8: Stickstoffgehalt, Aktivität und spezifische Aktivität der alkalischen Phosphatase in den Fraktionen des Hodens.

Bei einem der Versuche fielen folgende Reaktionskurven an:

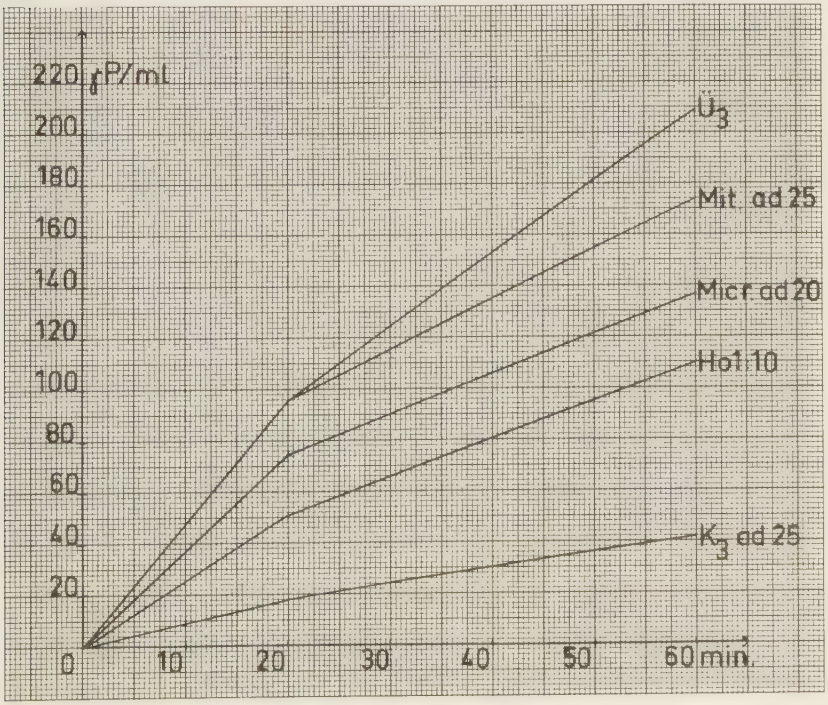


Abb. 11: Saure Phosphatase in den Fraktionen des Hodens.

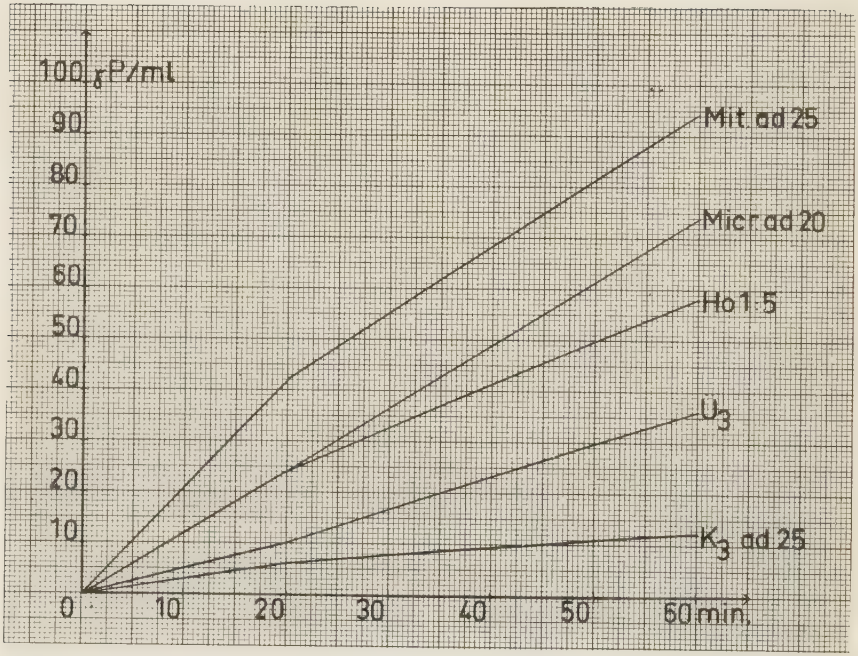


Abb. 12: Alkalische Phosphatase in den Fraktionen des Hodens.

c. Nebenniere.

Die Nebenniere hat in allen Fraktionen eine niedrigere spezifi - sche Aktivität als der Hoden. Die Verteilung der Aktivität entspricht der im Hoden.

Die folgenden Kurven (Abb. 13 und 14) zeigen den Verlauf eines Fraktionierungsversuches mit Nebennieren, die Tabellen 9 und 10 die Mittelwerte der Aktivitäten der einzelnen Fraktionen aus zwei Versuchen.

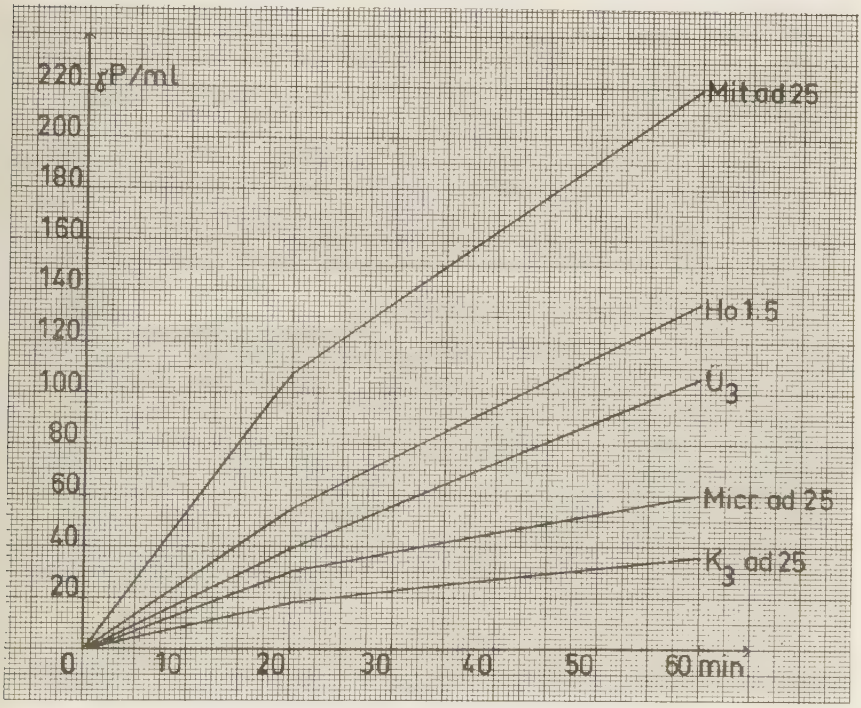


Abb. 13: Verlauf der Aktivitätsbestimmung in den Fraktionen der Nebenniere für die saure Phosphatase.

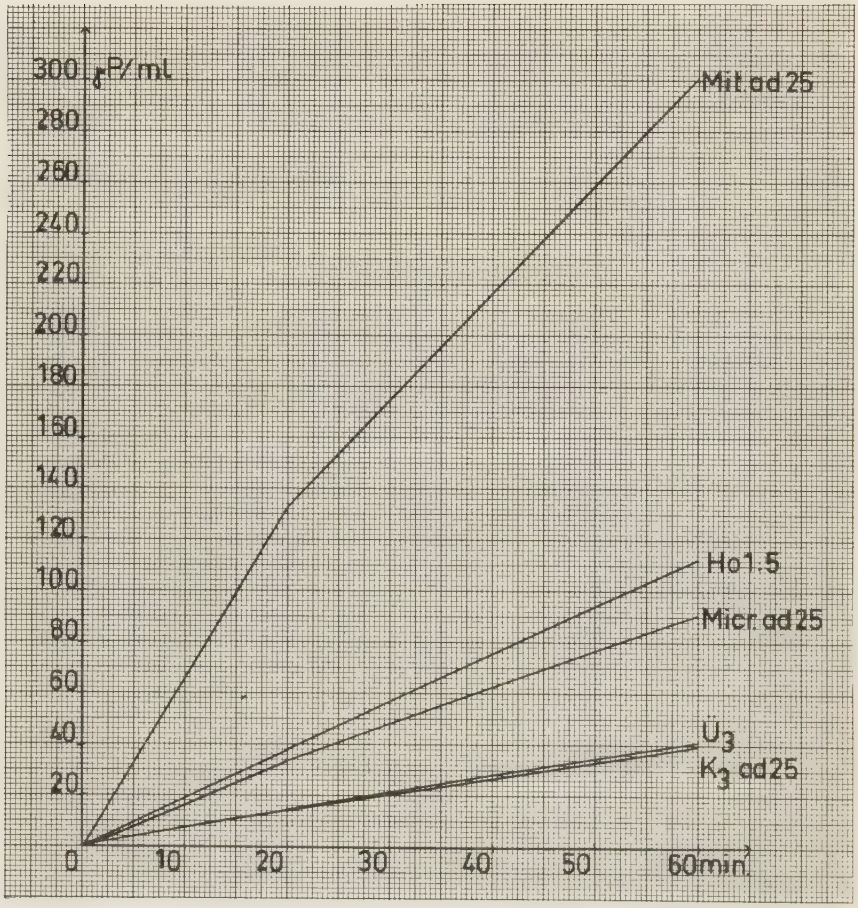


Abb. 14: Alkalische Phosphatase in den Fraktionen der Nebenniere.

Fraktion	Stickstoffgehalt mg N	%	Aktivität γP/h	%	spez. Aktivität γP/mg N/h
1 ml Ho	6,763	100,0	805	100,0	119 ± 15,6
daraus:					
K_3	0,519	7,7	24	2,9	47 ± 17,7
Mit.	1,708	25,2	172	21,3	101 ± 5,0
Micr.	0,648	9,6	79	9,8	122 ± 47,4
$Ü_3$	4,314	63,8	454	56,4	105 ± 17,7
Summe	7,189	106,3	729	90,4	

Tab. 9: Stickstoffgehalt, Aktivität und spezifische Aktivität der sauren Phosphatase in den Fraktionen der Nebenniere.

Fraktion	Stickstoffgehalt mg N	%	Aktivität γP/h	%	spez. Aktivität γP/mg N/h
1 ml Ho	6,763	100,0	560	100,0	83 ± 12,0
daraus:					
K_3	0,519	7,7	17	3,0	33 ± 17,0
Mit.	1,708	25,2	197	35,3	116 ± 19,1
Micr.	0,648	9,6	95	17,0	147 ± 42,4
$Ü_3$	4,314	63,8	169	30,2	39 ± 4,2
Summe	7,189	106,3	478	85,5	

Tab. 10: Stickstoffgehalt, Aktivität und spezifische Aktivität der alkalischen Phosphatase in den Fraktionen der Nebenniere.

d. Zusammenfassung der Fraktionierungsversuche.

In Abbildung 15 ist eine Übersicht über die spezifischen Aktivitäten in den Fraktionen der untersuchten Organe gegeben. Von der Null - Linie ist nach oben die saure, nach unten die alkalische Phosphatase, jeweils für dieselbe Fraktion desselben Organs aufgetragen.

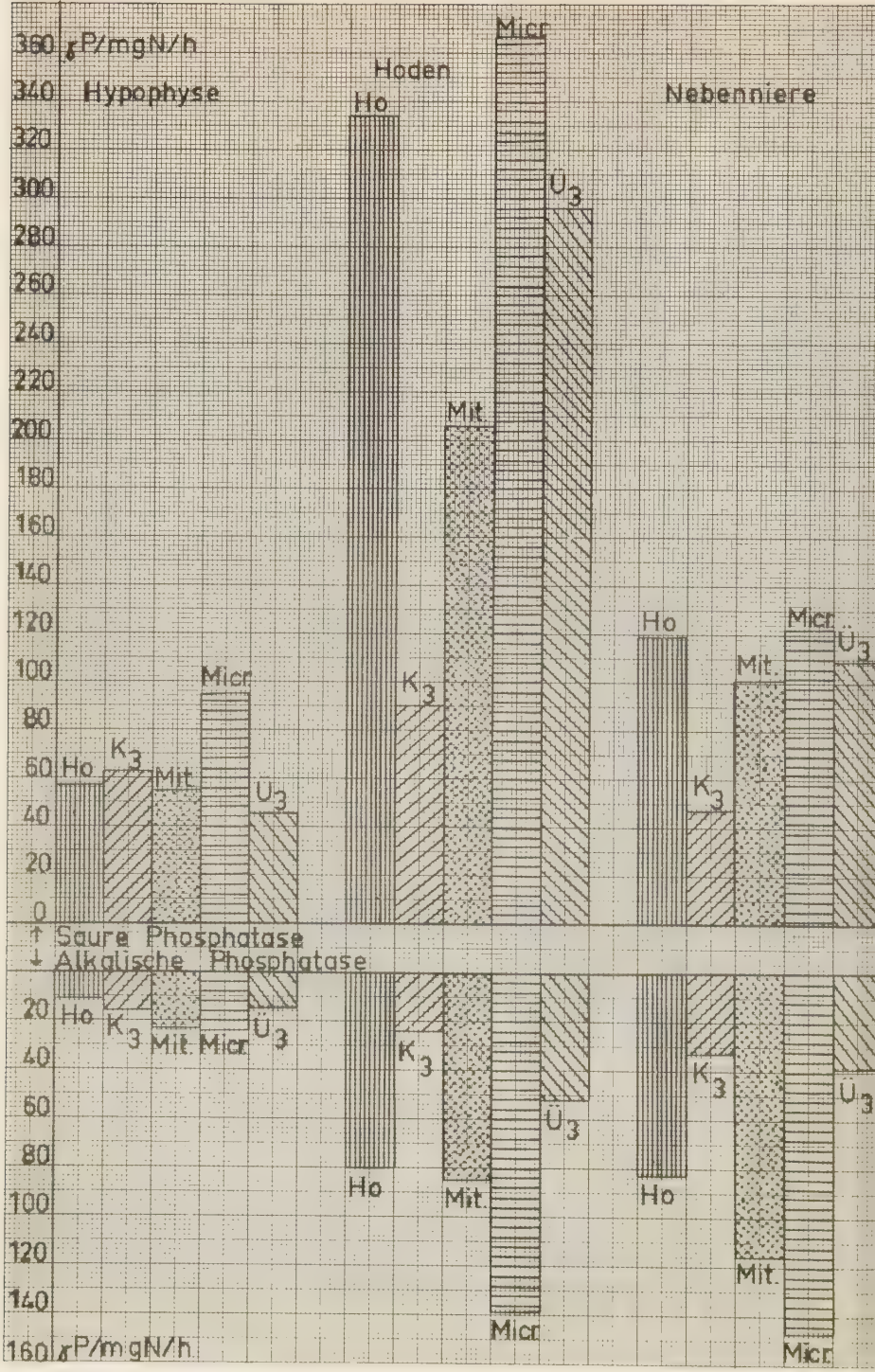


Abb. 15: Spezifische Aktivitäten in den Fraktionen.

3. Hormonversuche.

Es wurde die Einwirkung von FSH (Anteron) und LH (Primogonyl) auf die Phosphatase - Aktivität der Hypophyse, des Hodens, der Nebenniere und des jungen Corpus luteum untersucht.

Zunächst sollen die Verlaufskurven für je einen Versuch der untersuchten Organe dargestellt werden.

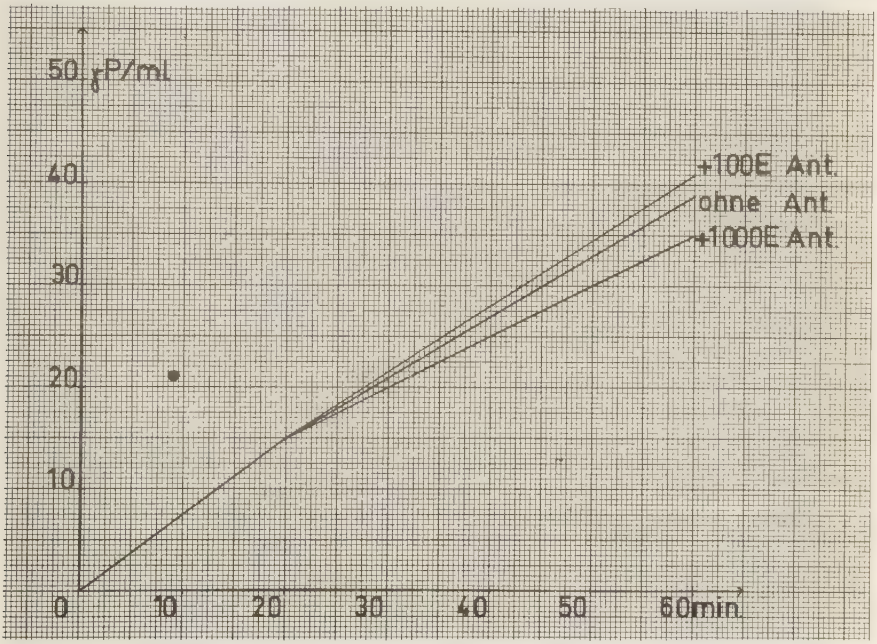


Abb. 16: Saure Phosphatase der Hypophyse bei Zusatz von Anteron. (Homogenat 1:10 verdünnt.)

Abkürzungen in den Kurven zu den Hormonversuchen (Abb. 16 bis 29):

Ho = Homogenat
Ant. = Anteron (FSH)
Prim. = Primogonyl (LH)

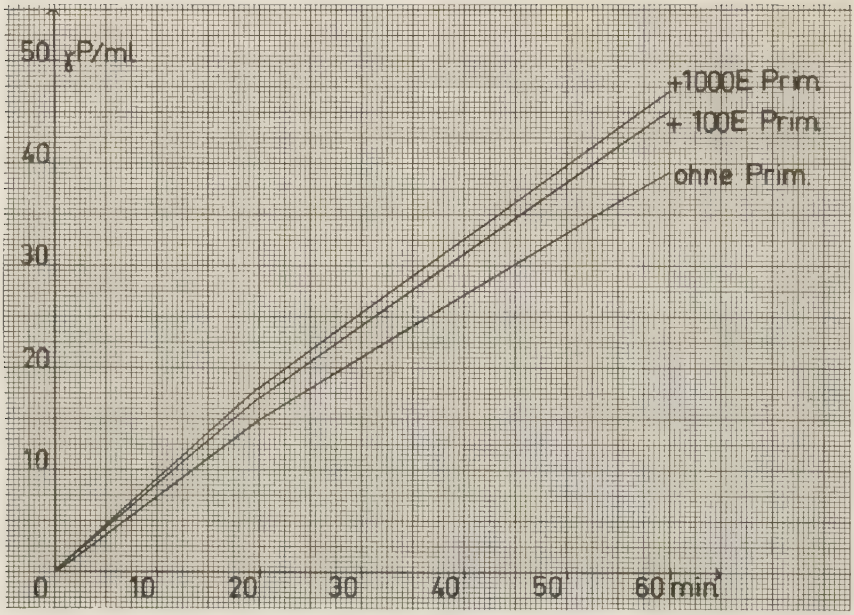


Abb. 17: Saure Phosphatase der Hypophyse bei Zusatz von Primogonyl (Homogenat 1:10 verdünnt).

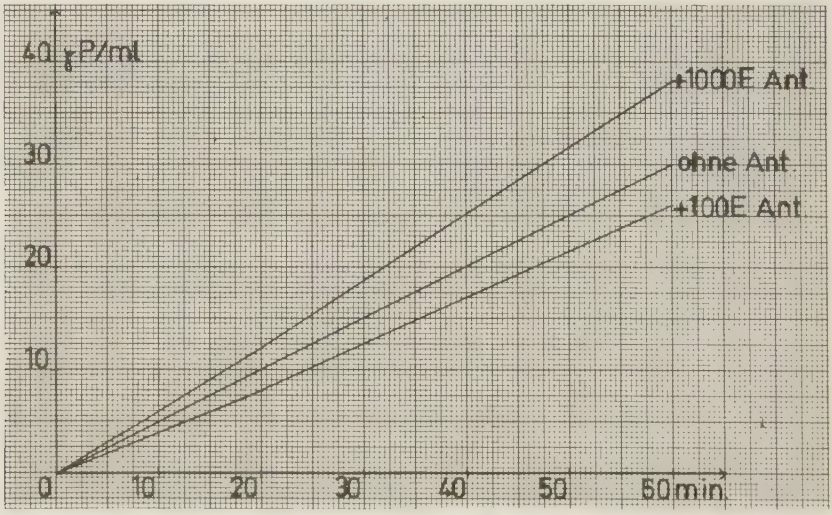


Abb. 18: Alkalische Phosphatase der Hypophyse mit Anteron. (Homogenat 1:5 verdünnt).

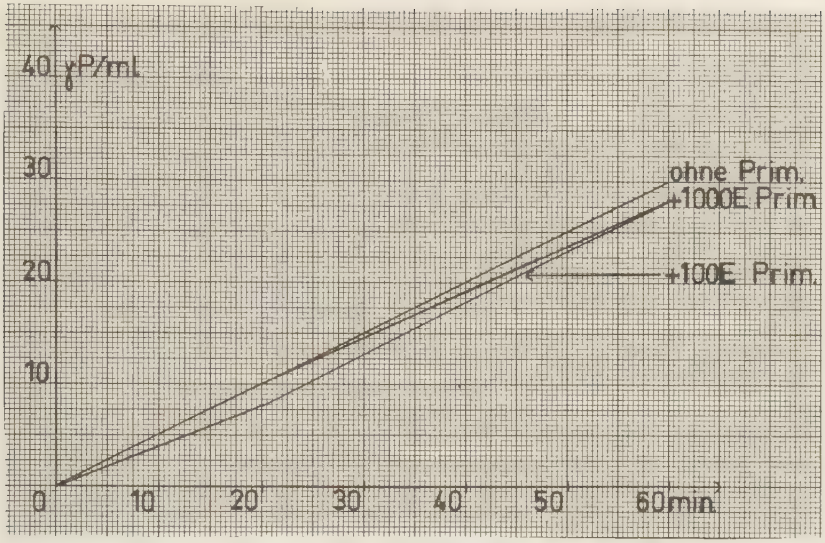


Abb. 19: Alkalische Phosphatase der Hypophyse mit Zusatz von Primogonyl. (Homogenat 1:5 verdünnt.)

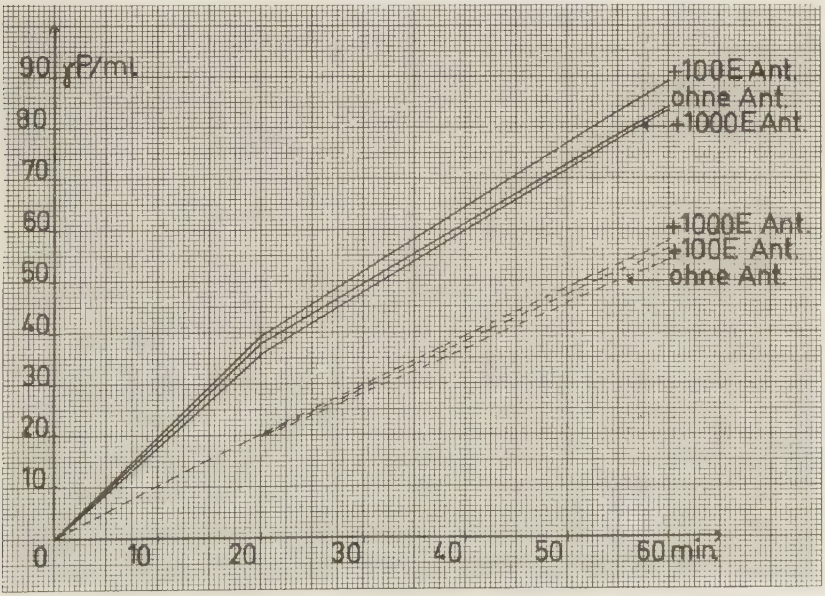


Abb. 20: Beide Phosphatasen im Hoden bei Zusatz von Anteron.
—— = saure Phosphatase,(Ho 1:10),---= alkalische Phosphatase(Ho 1:5).

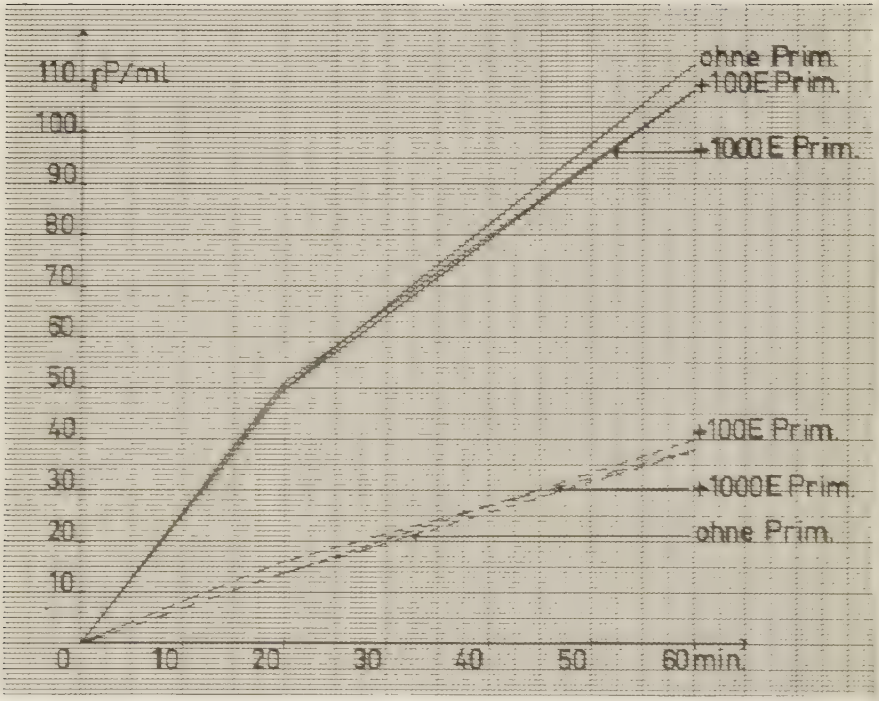


Abb. 21: Saure und alkalische Phosphatasen im Hoden bei Zusatz von Primogonyl.

—— = saure Phosphatase (Homogenat 1:10 verdünnt.)

--- = alkalische Phosphatase (Homogenat 1:5 verdünnt.)

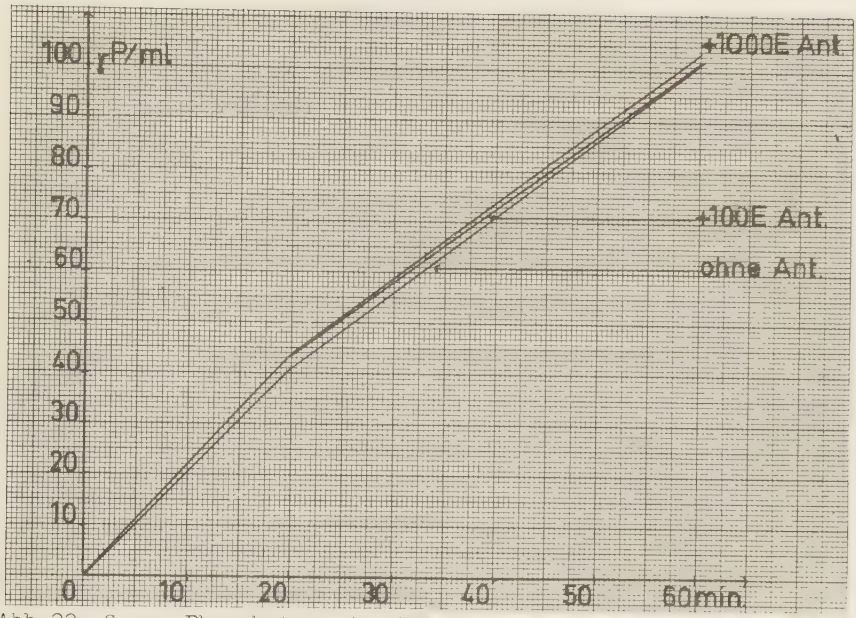


Abb.22: Saure Phosphatase der Nebenniere mit Anteron. (Ho 1:5)

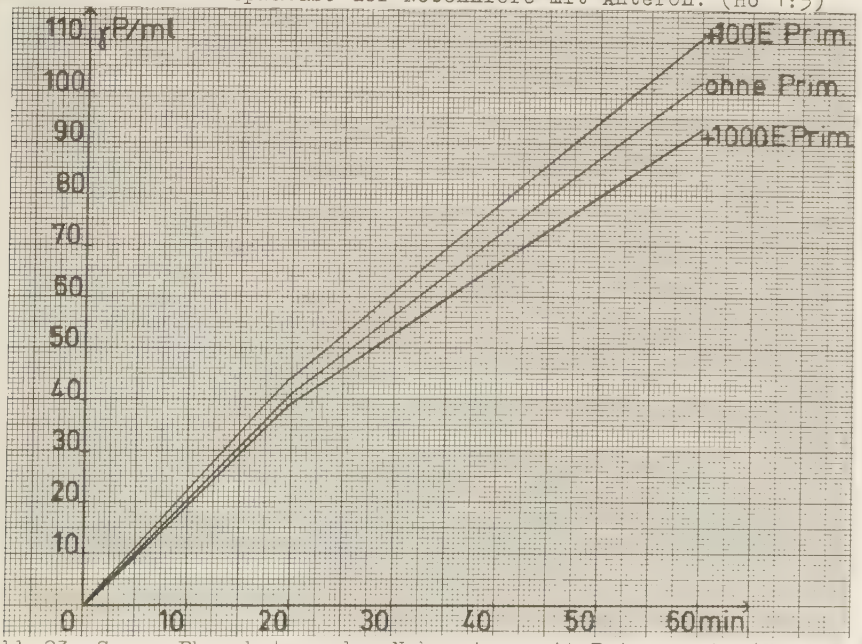


Abb.23: Saure Phosphatase der Nebenniere mit Primogonyl. (Ho 1:5.)

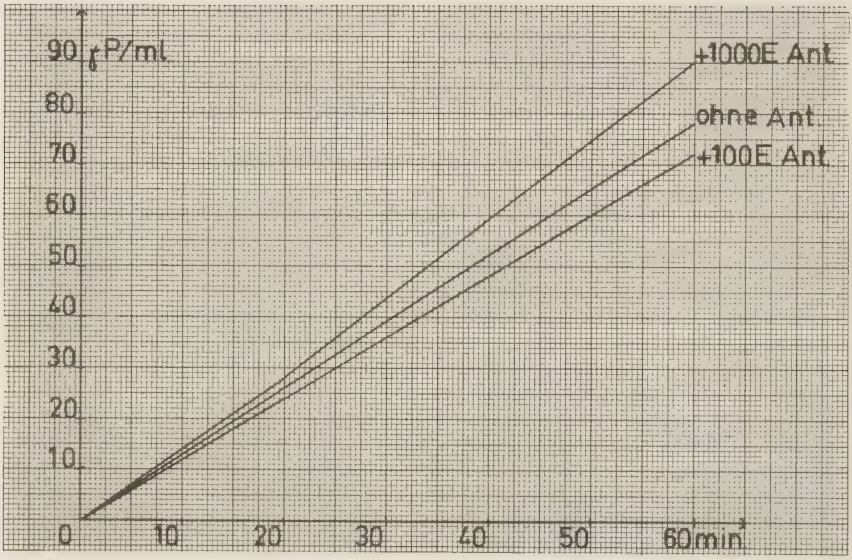


Abb. 24: Alkalische Phosphatase der Nebenniere bei Zusatz von Anteron. (Homogenat 1:5 verdünnt.)

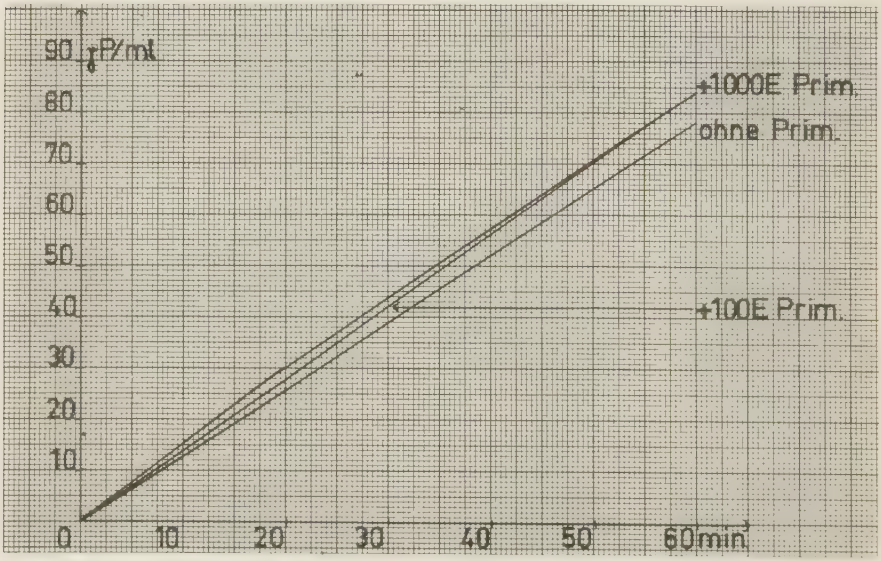
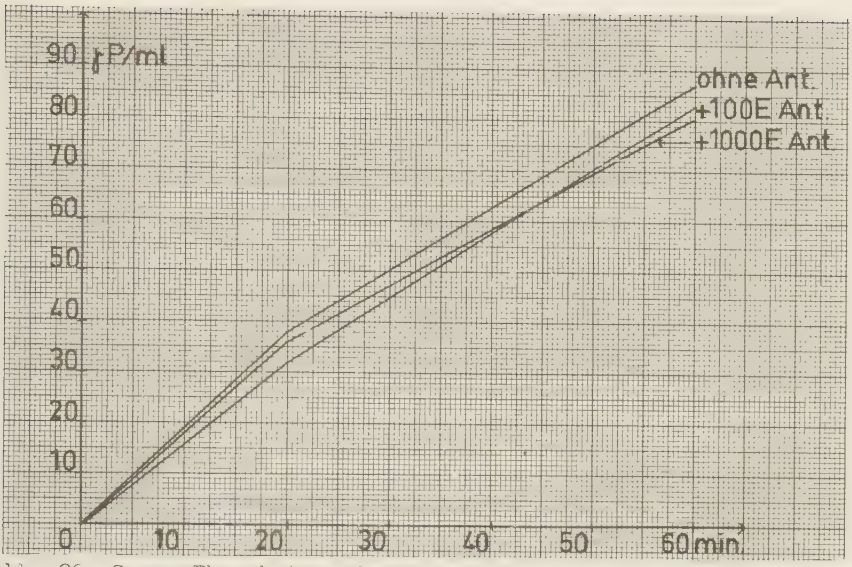


Abb. 25: Alkalische Phosphatase in der Nebenniere mit Zusatz von Primogonyl. (Homogenat 1:5 verdünnt.)



Abb, 26: Saure Phosphatase des jungen Corpus luteum bei Zusatz von Anteron. (Homogenat 1:10 verdünnt.)

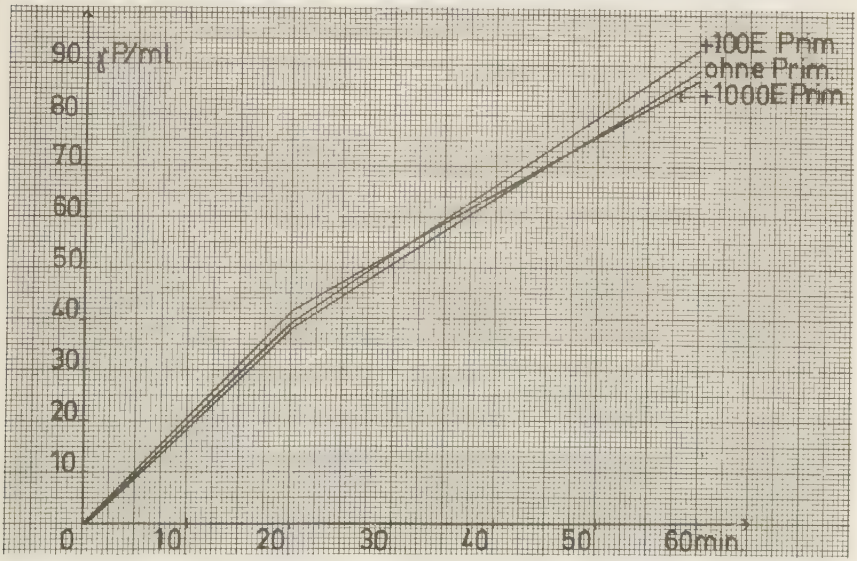


Abb. 27: Saure Phosphatase des jungen Corpus luteum mit Zusatz von Primogonyl. (Homogenat 1:10 verdünnt.)

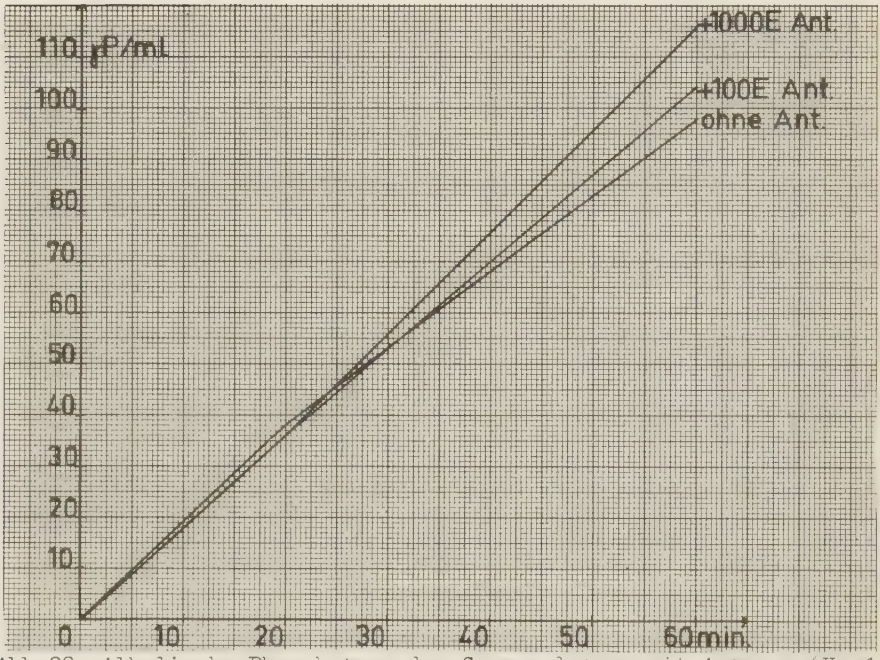


Abb.28: Alkalische Phosphatase des Corpus luteum mit Anteron.(Ho 1:1

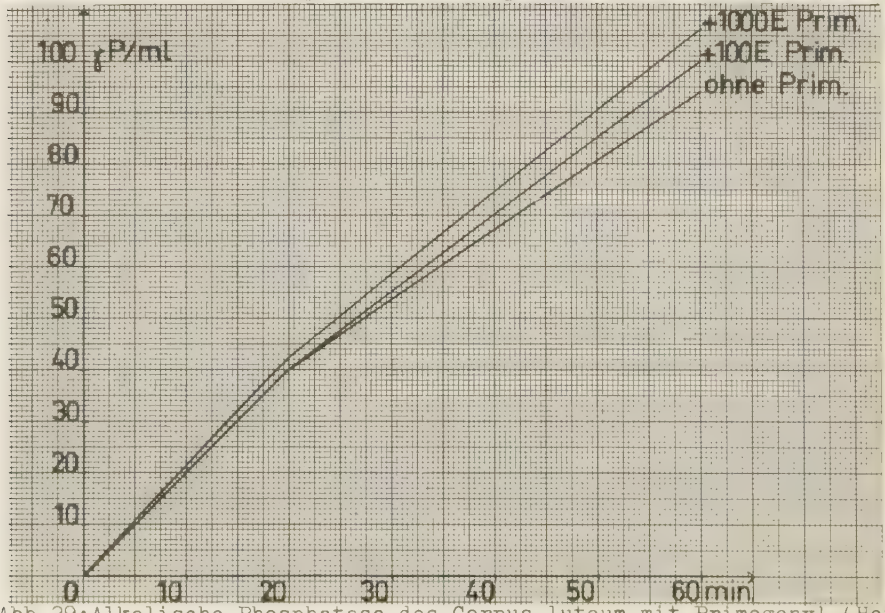


Abb.29:Alkalische Phosphatase des Corpus luteum mit Primogonyl.(Ho1:

Die als Beispiel für die Versuche am Hoden dargestellten Kurven wurden bei Einsatz verschiedener Homogenate für beide Hormone gewonnen, sodaß die Aktivitäten verschieden sind. Es wird deutlich, daß nur zusammengehörige Werte vom selben Homogenat zuverlässig zu beurteilen sind, wenn man nicht die Werte beispielsweise durch Bezug auf den Stickstoffgehalt vergleichbar macht.

Zur Beurteilung des Hormoneinflusses wird die durchschnittliche spezifische Aktivität des hormonfreien Ansatzes gleich 100 % gesetzt und die prozentuale Abweichung der mittleren spezifischen Aktivität bei Hormonzusatz bestimmt. Die Mittelwerte sind aus drei Versuchen gewonnen.(Tab. 11)

a. Hypophyse.

Ansatz	saure Phosphatase γ P/mg N/h	%	alkal. Phosphatase γ P/mg N/h	%
ohne Hormon	55 ± 6,8	100	17,6 ± 1,6	100
+ 1 000 E Anteron	57 ± 9,5	104	23,1 ± 1,6	131
+ 100 E Anteron	59 ± 13,2	108	16,4 ± 5,1	93
ohne Hormon	57 ± 9,5	100	17,6 ± 1,6	100
+ 1 000 E Primogonyl	63 ± 13,8	111	18,2 ± 1,0+	103
+ 100 E Primogonyl	62 ± 3,5	110	16,4 ± 5,2	93

b. Hoden.

Ansatz	saure Phosphatase γ P/mg N/h	%	alkal. Phosphatase γ P/mg N/h	%
ohne Hormon	318 ± 20,3	100	64 ± 18,1	100
+ 1 000 E Anteron	303 ± 13,5	95	77 ± 27,1	120
+ 100 E Anteron	311 ± 19,6	98	60 ± 21,5	93
ohne Hormon	342 ± 43,6	100	72 ± 24,2	100
+ 1 000 E Primogonyl	361 ± 23,3	105	72 ± 17,1	100
+ 100 E Primogonyl	365 ± 33,0	107	83 ± 36,9	116

Tab. 11a und b: Vergleich der mittleren spezifischen Aktivitäten mit und ohne Hormonzusatz für Hypophyse und Hoden (+=nur 2 Versuche).

c. Nebenniere.

Ansatz	saure Phosphatase γ P/mg N/h	%	alkal. Phosphatase γ P/mg N/h	%
ohne Hormon	132 ± 21,8	100	96 ± 24,5	100
+ 1 000 E Anteron	126 ± 33,6	95	103 ± 20,1	107
+ 100 E Anteron	126 ± 21,1	95	95 ± 19,6	99
ohne Hormon	131 ± 18,9	100	89 ± 11,4	100
+ 1 000 E Primogonyl	113 ± 5,6	86	91 ± 1,2	102
+ 100 E Primogonyl	129 ± 4,1	99	89 ± 3,1	100

d. Junges Corpus luteum.

Ansatz	saure Phosphatase γ P/mg N/h	%	alkal. Phosphatase γ P/mg N/h	%
ohne Hormon	217 ± 28,8	100	222 ± 45,0	100
+ 1 000 E Anteron	188 ± 49,8	87	213 ± 60,1	96
+ 100 E Anteron	188 ± 42,0	87	209 ± 64,0	94
ohne Hormon	208 ± 21,3	100	221 ± 45,4	100
+ 1 000 E Primogonyl	229 ± 29,0	110	243 ± 52,6	110
+ 100 E Primogonyl	215 ± 31,0	103	228 ± 47,5	103

Tab. 11c und d:Vergleich der mittleren spezifischen Aktivitäten mit und ohne Hormonzusatz für Nebenniere und junges Corpus luteum.

Die stärkste Abweichung ergibt sich bei der alkalischen Phosphatase der Hypophyse mit Zusatz von 1 000 E Anteron. Sie ist mit P = 0,02 zahlenmäßig eine echte Differenz und kein Zufallsergebnis.Trotzdem ist die Abweichung nur mit Zurückhaltung als Hormoneinfluß zu deuten, weil die 20-Minuten-Meßwerte bei der alkalischen Phosphatase so niedrig liegen, daß die unvermeidlichen Fehler in Methodik und Ablesung unverhältnismäßig großen Einfluß auf das Ergebnis haben.

Alle anderen Abweichungen in der Tabelle sind nach der statistischen Rechnung eindeutig nicht signifikant.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß ein sicherer Einfluß von FSH

oder LH auf die unspezifischen sauren und alkalischen Phosphatasen der untersuchten Organe nicht festzustellen ist.

D. Diskussion.

Ordnet man die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmungen in den untersuchten Organen nach fallender Höhe der spezifischen Aktivität, so bekommt man folgende Reihe:

Organ	saure Phosphatase	alkalische Phosphatase
Hoden	335 γP/mg N/h	γP/mg N/h
reifes Corpus luteum	259 "	
junges Corpus luteum		219 "
junges Corpus luteum	216 "	
altes Corpus luteum	180 "	
Corpus rubrum	155 "	
Nebenniere	138 "	
Corpus rubrum		125 "
Nebenniere		104 "
reifes Corpus luteum		89 "
Hoden		72 "
Hypophyse	57 "	
altes Corpus luteum		40 "
Hypophyse		15 "

Die höchste spezifische Aktivität an saurer Phosphatase zeigt also der Stierhoden, die aktivste alkalische Phosphatase besitzt das junge Corpus luteum, während die Hypophyse mit beiden Phosphatasen am Ende der Reihe steht. Bei allen Organen außer dem jungen Corpus luteum ist die saure Phosphatase aktiver als die alkalische, beim jungen Corpus luteum liegen beide etwa gleich. Besonders groß sind die Unterschiede zwischen saurer und alkalischer Phosphatase bei Hoden, reifen und alten Corpora lutea.

Im Verhältnis zu den hier gefundenen Werten liegt die Prostata auffallend niedrig mit der Aktivität ihrer sauren Phosphatase [41], nur etwas höher als die Hypophyse, während allgemein die Prostata als besonders reich an saurer Phosphatase gilt.

Im ganzen wäre eine hohe Phosphatasеaktivität in endokrinen Organen nicht unverständlich, wenn man die besondere Stoffwechselleistung dieser Organe einerseits und die Bedeutung der Phosphatasen für alle Stoffwechselvorgänge andererseits bedenkt. Hoden, Neben-

niere und Corpus luteum, die eine hohe Phosphatasеaktivität zeigen, produzieren alle Steroide. Das könnte in Einklang gebracht werden mit der Vermutung von OBER [36], daß die Phosphatasen in der Steroidsynthese eine Rolle spielen. OBER findet sie nämlich besonders in den hormonproduzierenden Zellen. THOMSEN [42] vermutet die Beteiligung der Phosphatasen an der Produktion der Oestrogene und des Progesterons im Syncytium der Plazentarzotten.

Alle drei Organe mit hoher Aktivität sind hypophysenabhängig. JUNG und NÜSSLEIN [25] finden in den hypophysenabhängigen Organen auch höhere Proteinaseaktivitäten als in unabhängigen Organen.

Bei der Untersuchung der intrazellulären Verteilung der Phosphatasen in Nebenniere, Hoden und Hypophyse ergab sich, daß stets die Fraktion Microsomen+Cytoplasma den größten Anteil an der Gesamtaktivität hatte, wobei der größere Teil bei Trennung von Microsomen und Plasma auf das Plasma entfiel. Eine Ausnahme davon machte die alkalische Phosphatase der Nebenniere, bei der die Mitochondrien aktiver waren als das Plasma und die Microsomen. Überall hatten die Kerne den geringsten Anteil an der Gesamtaktivität.

Diese Befunde stimmen gut überein mit Untersuchungen an anderen Organen:
Plazenta (AHMED und KING [1], W. JUNG und STARK [26]),
Corpus luteum (JUNG und A. KIDESS [23]),
Prostata (SIEBERT, JUNG und LANG [41]).

Vergleicht man die spezifische Aktivität der Fraktionen, so liegt bei allen drei Organen dieser Wert am höchsten in der Microsomenfraktion, während die Kerne bei Hoden und Nebenniere an letzter Stelle stehen. Bei der Hypophyse dagegen zeigen die Kerne eine auffallend hohe spezifische Aktivität.

Die Aktivitätsänderung der alkalischen Phosphatase im Entwicklungsverlauf des Corpus luteum mit einem Maximum beim jungen Corpus luteum und Abnahme der Fermentaktivität bei Rückbildung des Organs entspricht etwa den histochemischen Untersuchungen von MOSS, WRENN und SYKES [35] am Ovar der Kuh, während OBER [36] an menschlichem Material eine Zunahme der Aktivität bei Rückbildung des Corpus luteum findet.

Die zyklusgebundenen quantitativen und lokalisatorischen Differenzen der alkalischen Phosphatase lassen die Frage entstehen, ob diese Änderungen durch die Hypophysenvorderlappen - Hormone gleichzeitig mit den anderen Wirkungen dieser Hormone entstehen oder durch

die peripheren Geschlechtshormone bedingt sind. Sollten die Phosphatasen zur Steroidsynthese gebraucht werden, so wäre ein Einfluß der Gonadotropine direkt zu vermuten. Aber die angeführten Beobachtungen zeigen einen deutlichen Einfluß der peripheren Hormone (z. B. die Arbeit von ATKINSON und ELFTMAN [2], die hypophysektomierte Tiere mit Oestrogen behandelten, sodaß sicher kein Gonadotropin im Spiel war.)

Durch die vorliegenden in vitro-Versuche konnte auch kein Einfluß der Gonadotropine auf die Phosphataseaktivität sicher nachgewiesen werden. Die mögliche Aktivierung der alkalischen Phosphatase der Hypophyse durch Anteron müßte durch weitere Experimente bestätigt oder widerlegt werden. Es wäre seltsam, wenn gerade eine so geringe Aktivität durch das Hormon etwas gesteigert würde, zudem durch ein Hormon, das in derselben Drüse produziert wird und seine bekannten Wirkungen nach weitem Transport an den Gonaden entfaltet.

E. Zusammenfassung.

1. Hoden, Nebenniere, Corpus rubrum, Corpus luteum und Hypophyse wurden auf ihre Aktivität an unspezifischer saurer und alkalischer Phosphatase untersucht.

In allen Organen außer dem jungen Corpus luteum ist die saure Phosphatase aktiver als die alkalische. Im Hoden ist sie am aktivsten von allen untersuchten Organen. Bei Corpus rubrum, Corpus luteum und Nebenniere sind die Unterschiede der beiden Phosphatasen nicht sehr groß. Die Hypophyse zeigt eine besonders geringe Aktivität beider Phosphatasen.

2. Für Hoden, Nebenniere und Hypophyse wurde die Verteilung der unspezifischen Phosphatasen auf die Zellelemente durch fraktioniertes Zentrifugieren geprüft. Die höchste spezifische Aktivität zeigte dabei in allen drei Organen die Microsomenfraktion. Am niedrigsten lagen bei Hoden und Nebenniere die Kerne, bei der Hypophyse der Überstand (Cytoplasma).

3. Der Einfluß von FSH und LH auf die saure und alkalische Phosphatase in Hoden, Nebenniere, Hypophyse und im jungen Corpus luteum wurde in vitro untersucht. Ein sicherer Einfluß war nicht nachweisbar. Möglicherweise wird die alkalische Phosphatase der Hypophyse durch Anteron (FSH) aktiviert.

Fräulein Christiane Widemann danke ich herzlich für die Durchführung der Stickstoffbestimmungen.

F. Literaturverzeichnis.

1. Ahmed, Z. und E. J. King: Placental Phosphatases.
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 34, 313 (1959).
2. Atkinson, W. B. und H. Elftman: Mobilization of Alkaline Phosphatase in the Uterus of the Mouse by Estrogen.
Endocrinology 40, 30 (1947).
3. Atkinson, W. B. und E. T. Engle: Studies on Endometrial Alkaline Phosphatase during the Human Menstruous Cycle and in the Hormone treated Monkey.
Endocrinology 40, 327 (1940).
4. Augustin, E. und R. Huwald: Vorkommen und Aktivität der alkalischen Phosphatase im Eileiter des Weibes.
Arch. f. Gyn. 187, 406 (1956).
5. Bamann, E., C. Gösswein und J. Riehl: Auftrennung "der alkalischen Phosphatase" aus Leber in zwei Enzyme mit der Lokalisation im Zellkern sowie in den Microsomen bzw. in den Mitochondrien.
Natw. 47, 42 (1960).
6. Burger, H.: Untersuchungen über das Verhalten von saurer und alkalischer Serumphosphatase im Verlauf des Menstruationszyklus und unter Hormoneinfluß.
Arch. f. Gyn. 191, 134 (1958/59).
7. Corner, G. W.: Alkaline Phosphatase in the Ovarien Follicle and in the Corpus Luteum.
Contr. Embryol. Carneg. Inst. 32, 1 (1948).
8. Cox, R. P. und C. MacLeod: Hormonal Induction of Alkaline Phosphatase in Human Cells in Tissue Culture.
Nature (London) 190 , 85 (1961).
9. Dirscherl, W.: Fermente.
In: Seitz - Amreich: Biologie und Pathologie des Weibes.
Bd. I, 275. Urban und Schwarzenberg 1953.
10. Dirscherl, W.: Einwirkung von Steroidhormonen auf Enzyme und Enzymsysteme.
Symposion Nr. 4, Vorabdruck Nr. 7,
4. Internationaler Kongress für Biochemie, Wien, 1.-6.9.1958
11. Dirscherl, W. und H. Schriefers: Fermente.
In: Seitz - Amreich: Biologie und Pathologie des Weibes.
2. Erg.-Bd. S. 475. Urban und Schwarzenberg 1958.

12. Evans, A. J.: The in vitro Effect of Prolactin on ß-Glucuronidase in the Testis of the Rat.
J. Endocrinol. (London) 24, 233 (1962).

13. Fuhrmann, K.: Über die Endopeptidaseaktivität (Kathepsinkom - plex) des Endometriums und anderer Gewebe weiblicher Geschlechtsorgane.
Z. f. Geb.hilfe und Gyn. 154, 168 (1960).

14. Fuhrmann, K.: Hormone und Fermente des Endometriums.
Gynaecologia 152, 1 - 22 (1961).

15. Giering, J. E. und M. X. Zarrow: Changes in Uterin Morphology and Phosphatase Levels induced by chronic Stimulation with the Ovarien Hormones.
Acta endocrin. K'hvn. 29, 499 (1958).

16. Hibbard, E. W., P. L. Johnson und J. B. Field: An Effect of Anterior Pituitary Hormones on Bovine Corpus Luteum Phosphorylase.
Biochem. biophys. Res. Commun. 6, 129 (1961).

17. Hollemann, A. F. und F. Richter:Lehrbuch der organischen Chemie.
W. de Gruyter & Co, Berlin 1954.

18. Jenner, H. D. und H. D. Kay: Alkalische Phosphatase.
In: Hoppe - Seyler / Thierfelder: Handbuch der physiologischen und pathologisch - chemischen Analyse.
Bd. V, S. 176. Springer 1953.

19. Jones, H. W., R. wade und B. Goldberg: Biochemical and Histochemical Alkaline Phosphatase in normal Endometrium, Endometrium Hyperplasie and Adeno-Ca.
Amer. J. obstet. Gynec. 64,1364 (1952).

20. Jung, G.: Untersuchungen über proteolytische Enzyme des Ovarium.
Habilitationsschrift, Tübingen 1962.

21. Jung, G.: Fermentative Vorgänge im Ovar.
Arch. f. Gyn. 193, 285 (1959).

22. Jung, G.: Proteolytische Enzyme des menschlichen Eierstocks.
Z. Geb.hilfe und Frauenheilkunde 22, 10 (1962).

23. Jung, G. und A. Kidess: Proteolytische Fermente und Phosphatasen im Corpus luteum und Corpus rubrum vom Schweineovar.
Arch. f. Gyn. 196, 457 (1962).

24. Jung, G. und E. Kidess: Proteolytische Fermente im Ovargewebe.
Arch. f. Gyn. 192, 151 (1959).

25. Jung, G. und G. Nüsslein: Untersuchungen über proteolytische Enzyme in endokrinen Organen.

26. Jung, W. und G. Stark: Phosphatasen in der Plazenta und ihren einzelnen Zellfraktionen.
Arch. f. Gyn. 187, 398 (1956).

27. Jung, W. und G. Stark: Die Ursachen der Phosphataseerhöhung in der Spätschwangerschaft.
Zbl. Gyn. 78, 1201 (1956).

28. Lang, K. und G. Siebert: Die chemischen Leistungen der morphologischen Zellelemente.
In: Flaschenträger - Lehnartz: Physiologische Chemie, ein Lehr- und Handbuch. Springer 1954.
Bd. II 1b, S. 1064.

29. Lang, K. und G. Siebert: Aufarbeitung von Geweben und Zellen.
In: Hoppe - Seyler / Thierfelder: Handbuch der physiologischen und pathologisch - chemischen Analyse.
Bd. II, Teil 2, S. 537.

30. Leuthardt, F.: Lehrbuch der physiologischen Chemie.
W. de Gruyter & Co, Berlin 1959.

31. Lohmann, K. und L. Jendrassik: Colorimetrische Phosphorsäurebestimmung in Muskelextrakten.
Biochem. Z. 178, 419 (1926).

32. London, M. und B. P. Hudson: Studies on the Purification of Acid Prostatic Phosphatase.
Arch. Biochem. 46, 141 (1953).

33. Melchior, J. B. und B. S. Micuta: Effects of Administration of Estrogens upon Enzymes of Rat Pituitary.
Cancer. Res. 16, 520 (1956).

34. Moog, F. und E. R. Thomas: The Influence of various Adrenal and Gonadal Steroids on the Acumulation of Alkaline Phosphatas in the Duodenum of the Suckling Mouse.
Endocrinology 56, 187 (1955).

35. Moss, S., Wrenn, T. H. und I. F. Sykes: Some Histological and Histochemical Observations of the Bovine Ovary during the Estrous Cycle.
Anat. Rec. 120, 409 (1954).

36. Ober, K. G.: Die wachsende Aktivität der alkalischen Phosphatase im Endometrium und Ovar während des mensuellen Zyklus, sowie im Myometrium unter der Geburt. Eine histochemiscne Darstellung.
Klin. Wschr. 28, 9 (1950).

37. Ober, K. G. und M. Weber: Beitrag zur Progesteronwirkung.
Klin. Wschr. 29, 53 (1951).

38. Purr, A.: Über die Aktivierung des Katnepsins und Papains durch Follikelhormon.
Biochem. Z. 320, 74 (1949).

39. Roemer, H.: Über das regelmäßige Auftreten einer spezifischen Proteinase während des mensuellen Zyklus.
Klin. Wschr. 24 / 25, 116 (1946/47).

40. Samuels, L. T. und M. L. Helmreich: The Influence of Chorionic Gonadotropine on the 3ß-ol-Dehydrogenase Activity of Tests and Adrenals.
Endocrinology 58, 435 (1956).

41. Siebert, G., G. Jung und K. Lang: Intrazelluläre Verteilung von saurer Phosphatase in der Bullenprostata.
Biochem. Z. 326, 464 (1955).

42. Thomsen, K.: Über die Aktivität der alkalischen Phosphatase in der menschlichen Plazenta.
Arch. f. Gyn. 187, 1 (1956).

43. Troen, P. und E. E. Gordon: Perfusion Studies of the Human Chorionic Gonadotropine in Citric Acid Metabolisme.
J. Clin. Invest. 37, 1516 (1958).

Lebenslauf.

Am 26. Januar 1933 wurde ich als älteste Tochter des Mineralogen Dr. Karl Helmut Stützel und seiner Ehefrau Gerda, geb. Pistor, in Bad Godesberg am Rhein geboren. Meine Kinder- und Schulzeit verbrachte ich in Bad Godesberg, Darmstadt, Essen, Naumburg/Saale, Dortmund und Düsseldorf. Am 6. 3. 1953 bestand ich an der Cecilien - Oberschule in Düsseldorf - Oberkassel die Reifeprüfung.

Vom 1. 10. 1953 bis zum 30. 9. 1955 war ich Apothekerpraktikantin in der Linden - Apotheke, Düsseldorf und legte am 9.9. 1955 in Düsseldorf die pharmazeutische Vorprüfung ab. Vom Wintersemester 1955/56 bis zum Sommersemester 1958 studierte ich an der Friedrich-Wilhelms - Universität in Bonn Pharmazie und beendete dieses Studium am 24. 10. 1958 mit der pharmazeutischen Prüfung.

Im Wintersemester 1958/59 begann ich das Studium der Medizin an der Albert - Ludwigs - Universität in Freiburg und bestand dort am 1. 5. 1959 die naturwissenschaftliche Vorprüfung und am 30. 9. 1960 die ärztliche Vorprüfung.

Danach arbeitete ich in der Linden - Apotheke in Düsseldorf und erhielt im Juli 1961 meine Bestallung als Apothekerin.

Im Wintersemester 1961/62 setzte ich mein Medizinstudium an der Eberhard - Karls - Universität in Tübingen fort.

Dort bestand ich im Dezember 1964 die ärztliche Prüfung.